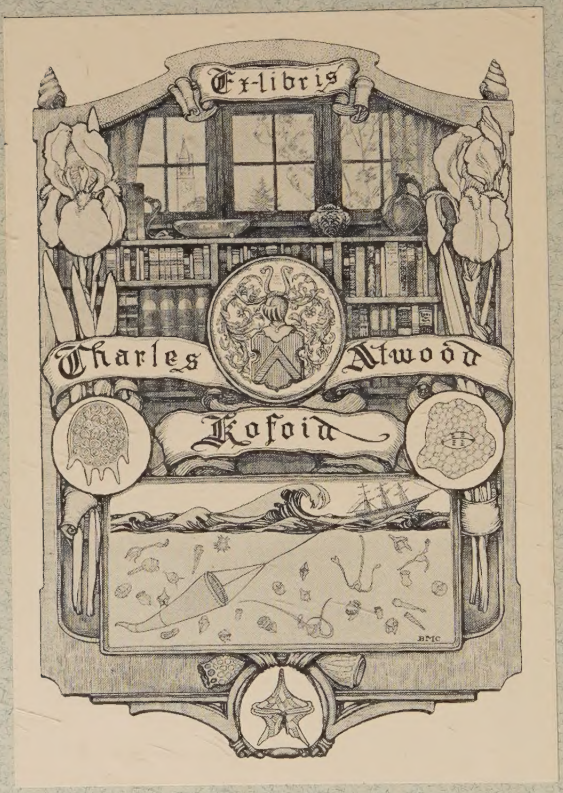
Thesis Utrecht 1902

OVER HET AFSTERVEN VAN BACTERIËN BIJ KOKEN ONDER LAGE DRUKKING.

J. SCHUT Jr


Ex-libris
Charles Atwood
Kofoid

OVER HET AFSTERVEN VAN BACTERIËN BIJ KOKEN ONDER LAGE DRUKKING

OVER HET AFSTERVEN VAN BACTERIËN BIJ KOKEN ONDER LAGE DRUKKING

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN

DOCTOR IN DE GENEESKUNDE

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT

NA MACHTIGING VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS

Dr. A. A. W. HUBRECHT

Hoogleeraar in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde

VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT

TEGEN DE BEDENKINGEN VAN

DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE

TE VERDEDIGEN

OP DONDERDAG 26 JUNI 1902

DES NAMIDDAGS TE 4 UREN

DOOR

JOHAN SCHUT

Semi-Arts

GEBOREN TE NUNSPEET

HARDERWIJK

FIRMA I. WEDDING

1902

AAN MIJNE OUDERS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/overhetafsterven0000vari

Het zij mij vergund U, Hoogleeraren en Lectoren der Medische en Philosophische faculteit, mijnen dank te betuigen voor het onderwijs, dat ik van U heb mogen genieten.

In het bijzonder richt ik een woord van dank tot U, Hooggeleerde Eykman, Hooggeachte Promotor. Ik beschouw het als een zeer groot voorrecht onder Uw leiding te hebben gewerkt; de belangstelling, die U steeds toonde te stellen in de uitkomsten mijner proeven maakte mij 't werk dubbel aangenaam.

INLEIDING.

Bij het gebruik van desinfectieovens met stroomenden waterdamp wordt doorgaans stilzwijgend aangenomen, dat men daarbij te doen heeft met stoom van 100° C.

Noch door Koch, wiens stoomsterilisator het laboratorium-model is geweest voor al dergelijke ovens, noch ook door hen, die het denkbeeld van Koch op de praktijk der ontsmetting hebben toegepast, is ooit de vraag gesteld, of het een noemenswaard verschil geeft, ten opzichte van de snelheid der desinfectie, of het water juist bij 100°, dan wel bij iets lagere temperatuur kookt. Men pleegt b.v. bij het gebruik van bedoelde ovens den barometerstand niet in aanmerking te nemen, en waarschijnlijk terecht, omdat niet wel is in te zien, waarom een verschil

van misschien een graad of een fractie daarvan in het kookpunt eenigen invloed van beteekenis zou hebben.

Een soortgelijke vraag doet zich voor bij het gebruik van desinfectieovens op plaatsen, die op een aanzienlijke hoogte boven de zee gelegen zijn; ook daar is 't kookpunt van water beneden 100° C.

In zijn Jaarverslag van het Laboratorium voor pathologische anatomie en bacteriologie te Weltevreden 1889[1]) heeft Dr. EYKMAN voor 't eerst hierop de aandacht gevestigd. Het was n.l. gebleken, dat een desinfectieoven te Willem I (Midden-Java; 400 M. boven de zee) niet aan de gestelde eischen voldeed; in een noot op pag. 368 zegt. Dr. EYKMAN:

„Wegens de hooge ligging van Willem I, ligt het kookpunt van water daar beneden 100° C.

In hoeverre deze omstandigheid een nadeeligen invloed heeft op het ontsmettend vermogen van den stroomenden waterdamp, is nog niet nagegaan. Het zal intusschen geraden zijn, daarop bij de keuze van een desinfectieoven te letten."

In een voordracht gehouden te Zutphen roert Dr. SALTET (Weekblad v/h. tijdschrift voor geneeskunde 1891) deze questie met een enkel woord aan.

Hij schrijft de slechtere werking van den desinfectieoven te Willem I toe aan de lagere temperatuur, waarbij het water daar kookt; terwijl Dr. EYKMAN later (v. d. KEMP, Quarantaine- en Epidemie-voorschriften 1892, blz. 307) meende te moeten betwijfelen of het verschil in kook-temperatuur daar op de bergen en op lager gelegen plaatsen voldoende was om deze slechte resultaten te verklaren. Hij

---

[1]) Gen. Tijdschr. v. Ned.-Indië, dl. 30, 1890.

meende, dat voor 't dooden der bacteriën niet zoozeer precies de temperatuur van 100° geeischt moest worden, maar wel dat 't water kookt, en men dus te doen heeft met *stroomenden* waterdamp.

Tot voor korten tijd was deze vraag echter nooit experimenteel onder de oogen gezien, totdat RUBNER (Hygien. Rundschau 1899) uitgebreide proeven nam over de desinfecteerende kracht van stoom, verzadigd en overzadigd, zoowel boven als beneden 100°; hierop kom ik later terug.

Ik heb nu getracht een antwoord te geven op de volgende vraag: bestaat er veel verschil in werking van verzadigden damp van 100° en van dien bij lagere temperatuur? In aansluiting daaraan bepaalde ik het weerstandsvermogen van verschillende microben tegenover koken en verwarmen en vergeleek ten slotte deze uitkomsten met die door stoom verkregen. Wat 't koken betreft, hier dacht ik vooral aan een schadelijke werking door de opstijgende dampbellen, die toch de vloeistof voortdurend krachtig bewegen.

Het is immers bekend, dat trillingen en schokken een slechten invloed kunnen uitoefenen op vele microben, hen dooden, of hun groei vertragen; en bovendien was het denkbaar, dat bij het koken ook in het bacterielichaam zich microscopische dampbelletjes vormden, die bij het barsten de bacterie of de spore uit elkaar deden springen of althans mechanisch beschadigden.

In de eerste plaats moest dus vastgesteld worden, of koken der vloeistof een nadeeliger invloed heeft dan verwarmen tot dezelfde temperatuur, en zoo ja, zijn er dan veranderingen aan 't bacterielichaam waar te nemen?

Dit verschil in werking was 't beste te controleeren door voor verschillende temperaturen de snelheid van afsterven bij koken en bij eenvoudige verwarming met elkander te vergelijken.

Hiervoor moest een inrichting worden bedacht, die niet alleen in staat stelde een vloeistof onder elken gewenschten druk, lager dan die der atmosfeer, te laten koken, maar bovendien mij veroorloofde af en toe een proefje van het geinfecteerde materiaal te putten, zonder dat hierbij de druk vermeerderde door toestroomen van lucht, waardoor de temperatuur zou stijgen. En daarnaast wilde ik gelijktijdig een zelfde bacteriënsuspensie bij dezelfde temperatuur verwarmen.

In afwijking van mijn oorspronkelijk plan zal ik dus achtereenvolgens behandelen: het koken en verwarmen bij temperaturen beneden 100°, en daarna den invloed van verzadigden stoom, eveneens beneden 100°, op de microben bespreken.

HOOFDSTUK I.

KOKEN BIJ LAGE DRUKKING TEGENOVER VERWARMEN.

A. *Methode van onderzoek.*

Een flesch (B) van ± 1 L. inhoud is luchtdicht gesloten door een caoutchouc-stop, waarin 4 doorboringen zijn gemaakt. (Zie plaat I).

Door de eerste doorboring is een thermometer (*t*) gestoken, de tweede bevat een glazen buis (*d*), voerende naar een terugvloeikoeler, waardoor de hoeveelheid en de concentratie van de vloeistof in de flesch constant blijven. De andere zijde van den terugvloeikoeler staat eenerzijds met een waterstraalluchtpomp in verbinding, ten einde de lucht in 't vat te kunnen verdunnen en zoo de vloeistof bij lager temperatuur te laten koken, anderzijds met een manometer (C).

Daar men echter bijna onmogelijk 't toestel zoo kan

maken, dat het absoluut luchtdicht is, en een klein lekje vooral bij den sterk verminderden druk, bijv. tot 50 à 100 m. m. Hg, en bij den geringen inhoud van de flesch een voortdurende snelle drukverhooging ten gevolge zou hebben, waardoor dus 't kookpunt en daarmede de temperatuur van den inhoud verhoogd werden, was in de buis van den koeler naar de luchtpomp nog een T stuk ingelascht, waarvan de derde arm voerde naar een luchtreservoir.

Een bemande flesch van ± 60 L. inhoud deed als zoodanig dienst. Kleine hoeveelheden lucht, die dus door een lek naar binnen kwamen, werden over dien grooten inhoud verdeeld, en gaven slechts een uiterst langzame druk- en temperatuursverhooging, die zeer gemakkelijk overwonnen kon worden door af en toe even de luchtpomp in werking te zetten. Op die wijze gelukte het de inhoud der flesch B op elke gewenschte temperatuur (beneden 100°) aan den kook te brengen en zeer nauwkeurig op die temperatuur te houden.

(Met opzet werd een bekleede flesch gekozen, daar immers dan de verandering der kamertemperatuur minder invloed had op den druk van de lucht daarin).

Door de derde opening in den caoutchoucstop steekt een dikke buis, waarin een kraan (K) is aangebracht. Het boveneinde van de buis is voorzien van een stuk caoutchoucslang (*m*), van ongeveer 5 cM. lengte. In de vierde opening hangt een reageerbuis (*r*), waarvan het ondereinde, als de stop op de flesch is gezet, zich ongeveer $^3/_4$ cM. boven den bodem bevindt.

De flesch B staat tot aan den hals in een waterbad met constant niveau, gedekt door een goedslui-

tend deksel, de stoom vindt een uitweg door de afvoerbuis (*a*).

Vooral bij proeven, waar de temp. in de flesch 95° à 100° bedroeg, moest het waterbad zoo hoog verwarmd worden, dat de stoom zonder dezen afvoer zeer hinderlijk zou geweest zijn. Later werd de flesch nog vervangen door een geëmailleerd metalen vat van denzelfden inhoud, ten eerste uit oeconomische overwegingen, daar de flesch bij eenig verschil van temperatuur van den inhoud en omgeving zeer licht barst en ten tweede is de warmtegeleiding natuurlijk veel beter.

Bij het begin eener proef werd de luchtdruk in het geheele toestel zoover verminderd, tot hij overeenkwam met de temperatuur, waarbij ik werken wilde.

Inmiddels wordt het waterbad verwarmd, en wanneer de inhoud van de flesch de gewenschte temperatuur heeft bereikt, begint het koken. Om dit koken duidelijk waar te kunnen nemen, werd onder in de vloeistof een stukje glas gelegd, dat door opspringen en neervallen voortdurend tikte; trouwens ook aan het terugvloeien van den gecondenseerden stoom uit den koeler, kon men 't koken bemerken.

Kookte de vloeistof goed, dan werd door de caoutchouc buis (*m*) een glazen cylindertje, gevuld met bouilloncultuur der te onderzoeken microben, op de stop van de kraan K gezet.

Door nu met den vinger de caoutchoucbuis van boven af te sluiten en de kraan te openen, viel 't cylindertje in de kokende vloeistof en gaf, door het vallen op den bodem precies het moment aan, waarop de vloeistof geïnfecteerd werd. Te voren had ik, door een dergelijken cylinder

gevuld met methyleenblauw in een kolf met kokend water te laten vallen, gezien, dat de inhoud zich direct in de kolf verdeelde.

Om nu telkens uit deze bij lageren druk kokende vloeistof een proefje te kunnen nemen, gebruikte ik een glazen staaf (*s*) van die dikte, dat ze juist paste in de caoutchouc buis aan 't boveneinde van de kraan. (Zie hiervoor de teekeningen K_I en K_{II} op plaat I.)

Onder aan de glazen staaf (*s*) is een platina-spiraal ingesmolten, die tot in de vloeistof gebracht, daarvan een druppel ter grootte van ± 10 mM^3. meevoert. De caoutchouc buis en de kraan werden vrij wijd genomen ongeveer 9 mM., om een dikke staaf door te kunnen laten. Dit toch had een dubbel voordeel. In de eerste plaats was er minder gevaar, dat de platinadraad bij 't in- en uithalen uit het buisje den binnenwand kon infecteeren door 't heen en weer zwikken, en in de tweede plaats bleef het water en het vet, dat voor 't beter glijden aan de staaf werd gesmeerd, daar onderaan hangen, terwijl het bij een dun staafje langs den platinadraad in de spiraal zou geloopen zijn, en dus zeer storend zou gewerkt hebben. 't Condenseeren van waterdamp langs de staaf kon ik bijna geheel beletten door deze voor iedere proefneming goed te verwarmen. Ik bracht nu voor het putten van een proefje, terwijl de kraan gesloten was, de staaf zoover in de caoutchouc buis, tot dit goed er om heen sloot, daarbij oppassende, dat de spiraal de stop van de kraan niet raakte; de kraan kon dan geopend worden zonder dat de lucht toetrad, en de staaf werd in 't vat geschoven tot een caoutchouc ringetje, er om gelegd, het buisje raakte; door voorafgaande peiling wist ik, dat de

spiraal dan in de vloeistof was; 't ondereinde der staaf echter nog niet.

Daarna werd deze opgehaald tot de platinadraad weer boven de kraan was, hetgeen ik voelen kon aan de caoutchouc buis, dat dan aangezogen werd. Wanneer men nu zoo de kraan zou willen sluiten en de staaf daarna verder uittrekken, zou het caoutchouc tegen de beladen spiraal aangezogen en geinfecteerd worden.

Dit werd echter voorkomen door twee kleine gaatjes (*o* en *g*), die in de kraan waren geboord, zooals de teekening aangeeft. Sloot ik nu de kraan, dan kon er lucht toetreden in de ruimte (*h*) tusschen kraan en staaf, en bleef de spiraal vrij. Ik behoefde dan slechts de staaf verder uit te trekken en had een monstertje. Door uit te zaaien in agar-agar bleek, of het nog levensvatbare kiemen bevatte.

De vloeistof in de reageerbuis *r* gedaan, werd geinfecteerd met een platinaoogje met cultuur en ook daaruit werd nu telkens een proefje genomen. Zij had, zooals ik herhaaldelijk door een thermometer controleerde, op een kleine fractie van een graad na, dezelfde temperatuur als de inhoud van de flesch; op die wijze konden dus (behoudens het kleine temperatuurverschil, hetwelk, zooals de uitkomsten leerden, verwaarloosd mocht worden) de proeven met koken en verwarmen steeds te gelijkertijd en volkomen onder dezelfde omstandigheden genomen worden.

De proefjes uit het reageerbuisje werden genomen met een platina-lis, die ingesmolten was in een glazen staaf, zoo dik, dat zij juist in de buis paste. Hierdoor werd eveneens voorkomen, dat bij het uithalen het platina-

oogje den wand raakte, dezen infecteerde, en dus een gedeelte van de kiemen in andere conditie bracht, die derhalve bij een volgende proefneming 't oogje konden infecteeren. Wat de temperatuur in de flesch en in de reageerbuis betreft, hierbij deed zich nu en dan een eigenaardig verschijnsel voor. Op eenige cM. afstand boven den vloeistofspiegel was de temperatuur soms een of twee graden hooger dan die der vloeistof, en vooral was dit verschil sterk bij de proeven, waarbij melk als medium werd gebruikt.

Ik meen de verklaring hierin te moeten zoeken, dat het water in het waterbad veel warmer was dan de vloeistof, die in de flesch kookte; de wand boven de vloeistof deelde dus warmte mede aan den stoom en de reageerbuis, en deed de temperatuur daar stijgen. Door te zorgen, dat het verschil in temperatuur van het waterbad en den inhoud der flesch niet al te groot werd, kon ik voorkomen, dat de bovenste vloeistoflaag in de reageerbuis sterker verwarmd werd dan de rest.

Hoewel ik nu bijna altijd met gemakkelijk herkenbare bacteriën werkte, spreekt het toch van zelf, dat bijkomende infecties zooveel mogelijk moesten vermeden worden.

Hiervoor was het noodzakelijk het vet, waarmede kraan en staaf ingesmeerd werden, te steriliseeren, glazen staven te flambeeren en de flesch met stop en kraan voor iedere proef gedurende een kwartier in de autoclaaf op 115° te verhitten. Reeds te voren deed ik er dan de benoodigde hoeveelheid vloeistof in, zoodat deze tevens nog eens gesteriliseerd werd.

Ook de reageerbuizen voor de proeven zonder koken werden op dezelfde manier behandeld. Hierdoor gelukte

het mij zoo goed als iedere verontreiniging te voorkomen.

Verder is nog van groot belang, dat de flesch weinig vloeistof bevat; want doet men er te veel in, dan spatten er druppels in den koeler en vallen na eenigen tijd afgekoeld in de flesch terug, iets wat mij in den aanvang meermalen gebeurde. Ten slotte verdient het om soortgelijke redenen nog aanbeveling den hals van de flesch met een warmte isoleerende laag te bekleeden, waardoor de ondervlakte van de stop een temperatuur behoudt weinig afwijkende van die van den kokenden inhoud.

Aanvankelijk werd ieder proefje geënt in bouillon, doch weldra bleek, dat deze methode practisch onbruikbaar was.

Wanneer men immers bij het begin der proef per mM^3. eens 500 kiemen heeft ingebracht, zullen deze natuurlijk niet alle tegelijk afsterven, zooals ook bleek bij de later door mij gevolgde methode; velen zijn reeds vrij spoedig dood, andere houden 't langer uit, terwijl enkele, soms 1 of 2 in een platina-oogje, zich veel resistenter toonen.

Ent men nu in bouillon, dan zal men aan de daaruit verkregen culturen niet kunnen zien of 't aantal kiemen afgenomen is; die enkele hardnekkigen zullen de bouillon evengoed troebel maken of kleuren, terwijl het voor ons doel toch beter was met die enkele kiemen geen rekening te houden.

De sterilisatieproeven, waarbij men niet quantitatief werkte, moeten dus van minder waarde geacht worden, en de tijden hierbij opgegeven zullen doorgaans te lang genomen zijn.

Bij mijn proeven maakte ik daarom steeds gebruik van

rolbuizen, aanvankelijk van gelatine, later van agar-agar. De agar-rolbuizen hadden voor ons verschillende voordeelen boven die van gelatine.

In de eerste plaats bij de proeven met bacteriën, die gelatine doen vervloeien, wat quantitatief werken moeilijker maakt; verder vereischt het rollen van agar veel minder tijd en is het mogelijk te kweeken bij 37°, wat met name voor pathogene kiemen een groot voordeel is; men behoeft minder lang op de uitkomsten te wachten. Men kan de agar af laten koelen tot 40° alvorens ze stolt, en deze temperatuur is voor alle door mij onderzochte microben onschadelijk, althans gedurende den korten tijd, die voor het rollen noodig is.

Ten slotte nog een voordeel van quantitatieve kweekproeven boven bouillon-cultuur.

Hierdoor is het tevens mogelijk individueele afwijkingen in den groei der kolonies waar te nemen, zooals vertraging, ophouden van fluorescentie bij bac. fluorescens en het optreden van de witte variëteit van bacillus prodigiosus, afwijkingen, die bij cultuur in bouillon verborgen kunnen blijven.

Het verdient aanbeveling de agar-rolbuizen omgekeerd in de broedstoof te zetten, ten einde het expressie-water te laten opnemen door de wattenprop, het verzamelt zich anders op den bodem en belet de zich daar ontwikkelende kolonies te tellen. Ook zal men goed doen in plaats van 1.5 % agar iets meer, tot 2 % toe, te nemen.

Als vloeistof, waarin de bacteriën en sporen gesuspendeerd werden, gebruikte ik steriele physiologische keukenzout-oplossing. Was immers mijn onderstelling

juist, dat zich door het koken in het bacterielichaam dampbelletjes vormden, waardoor bij het barsten een totale of gedeeltelijke vernieling plaats greep, dan moest de vloeistof minstens een even hooge osmotische spanning hebben als het inwendige van het bacterielichaam, anders zou toch de vloeistof koken, terwijl het celvocht der bacterie nog niet die temperatuur bereikte, waarbij zich dampbelletjes konden vormen. Wel is de sterkte 0.9 Nacl eenigzins willekeurig gekozen, doch deze scheen mij met het oog op de osmotische spanning van het menschelijk celvocht de eigenaardigste.

De vergelijkende proeven over den invloed van koken en verwarmen, op grond waarvan de ondervolgende krommen zijn samengesteld, zijn steeds genomen met een bouillon-cultuur van 24 uur oud, gesuspendeerd in physiologische keukenzout-oplossing.

Met opzet koos ik culturen niet ouder dan 24 uur. Uit de onderzoekingen o.a. van Hehewerth (de microscopische telmethode van Alex Klein en eenige harer toepassingen. Acad. Proefschrift, Amsterdam 1902) blijkt, dat in iederen voedingsbodem het aantal levende kiemen na verloop van een bepaalden tijd gestadig afneemt; die vermindering hangt in de eerste plaats af van den voedingsbodem, en verder vertoonen de microben onderling groot verschil. Voor bac. coli vond H. nu, dat tusschen 24 en 29 uur een groot aantal afsterft. In dergelijke culturen heeft men dus naast de volkomen normale kiemen ook vele, die reeds op het punt staan te sterven; deze zullen natuurlijk tegenover iedere schadelijke inwerking minder resistent zijn.

Om nu in alle opzichten vergelijkbare waarnemingen

te krijgen, werd de cultuur steeds ongeveer even oud en wel van 20—24 uur genomen.

Wat het samenstellen der curven betreft, hierover een enkel woord.

Voor iedere microbe werd bij verschillende temperaturen het oogenblik bepaald, waarop de kiemen waren afgestorven, en deze punten werden met elkaar verbonden. Duurde de proef 20 tot 40 min., dan werd in den regel iedere 5 min. een monstertje genomen, duurde zij langer, dan geschiedde het ieder kwartier; bij korteren duur koos ik kortere tijden, bijv. 1, 3, 6, 9 min. of 1, 4, 8, 12 min. Te voren was bij twee of drie uiteenloopende temperaturen een voorloopige proef met grootere tusschenpoozen genomen, ten einde eenigszins een denkbeeld te krijgen van den tijd voor het dooden der kiemen vereischt.

Ik kreeg dus telkens een serie rolbuizen, waarvan de eersten meer of minder talrijke kolonies vertoonden, de laatsten steriel waren.

Vond ik nu, dat b.v. na 20 minuten koken of verwarmen nog enkele kolonies verkregen waren, na 25 minuten geen een meer, dan werd de kromme midden tusschen beide tijden doorgetrokken.

't Kwam echter ook meermalen voor, dat na verloop van een bepaalden tijd koken of verwarmen nog slechts eén of twee kolonies opkwamen, terwijl de daaraan voorafgaande rolbuis er veel meer bevatte, in dat geval nam ik als tijd van afsterven aan, 't oogenblik, waarop het monster, waarin die enkele kiem nog slechts leefde, genomen was.

Daar het echter uit een practisch oogpunt van belang

was de bacteriën ook in andere substraten te onderzoeken, heb ik eveneens proeven genomen in versche melk, en voor waterbacteriën in gewoon water. Bac. prodigiosus en pyocyaneus waren aangewezen voor de proeven met melk. Ik wilde, daar het mij te doen was om den invloed van den aard van het menstruum na te gaan, de melk niet te voren steriliseeren met het oog op de daardoor optredende chemische veranderingen; bovengenoemde bacillen waren door hun kleur gemakkelijk te onderscheiden van de kolonies der reeds te voren aanwezige kiemen, wanneer men ten minste afziet van de enkele witte prodigiosus. Bovendien kon een microscopisch praeparaat in twijfelachtige gevallen doorgaans 't noodige licht verschaffen.

B. *Resultaten.*

Als representanten der saprophyten gebruikte ik de gemakkelijk herkenbare bac. prodigiosus en fluorescens; van de parasieten koos ik bac. pyocyaneus, coli, typhi; van de sporehoudende de bac. anthracis. Daarna deed ik nog eenige proeven met mengsels van bacteriën in hun natuurlijk milieu, melk en grachtwater.

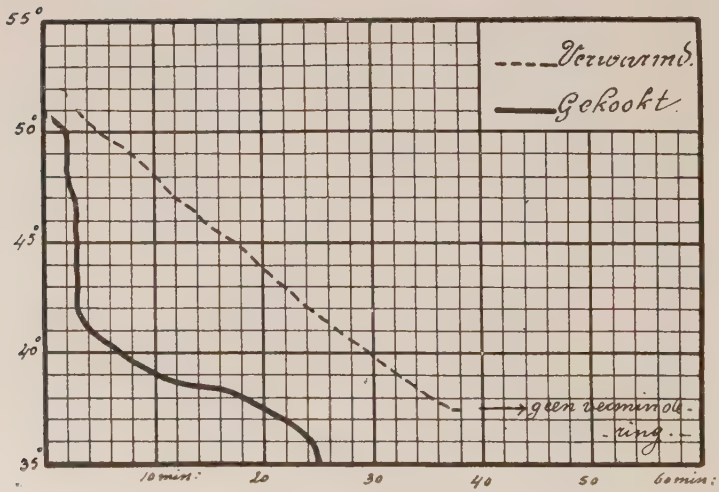
Bac. Fluorescens liquef.

Deze mag als type van een saprophyt gelden. Hij groeit niet meer bij temp. boven 30°, en werd voor onze proeven gekweekt bij 22°.

Alvorens de krommen van het afsterven te geven wil ik eerst in een tabel de cijfers mede deelen, waaruit zij werden samengesteld.

Temperatuur.	Gekookt.	Verwarmd.
55°	< 1′	< 1′
53°	< 1′	< 1′
52°	< 1′	< 1′
50°	2′	5′
48°	2′	10′
46°	1 — 4′	10—15′
45°	1 — 4′	15—20′
43°	1 — 4′	20—25′
41°	2 — 5′	25—30′
40°	5—10′	30—35′
38°	15—20′	35—45′
35°	20—30′	geen vermindering
33°	> 1 uur	„

Bacillus fluorescens liq.



Van alle der door mij onderzochte microben is deze 't minst tegen hitte bestand. Bij een temp. van 41° sterft hij reeds door *koken* binnen vijf minuten, terwijl bij eenvoudige *verwarming* van 't medium tot 41° de dood eerst intrad, als de proef een half uur lang werd voortgezet. Door een temperatuur van 52° wordt hij binnen één minuut gedood, zoowel door koken als door eenvoudige verwarming.

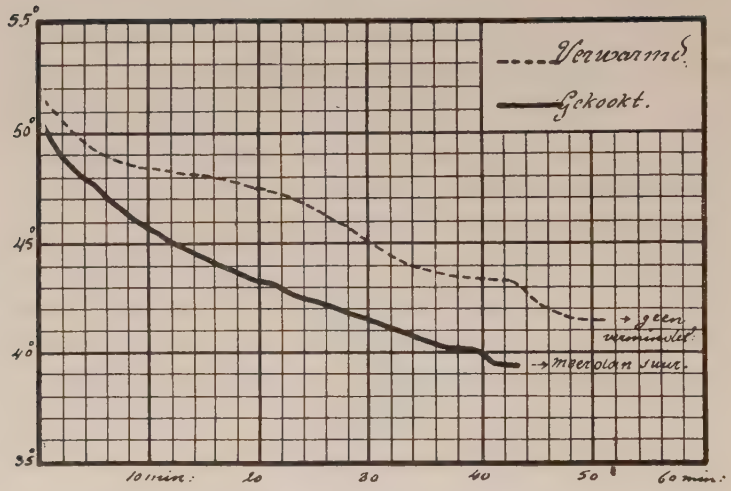
Aan 't afsterven gaat een periode vooraf, waarin de bacillen voor een groot deel nog leven, maar 't vermogen van fluorescentie reeds verloren hebben; bij een temperatuur van 38° verdwijnt deze door verwarmen na ± 20 min., bij koken reeds na 5 à 10 min.

't Grootste verschil tusschen koken en verwarmen vond ik bij 40° en lager.

Zonder koken was bij 35° ook na 2 uur geen vermindering in 't aantal levensvatbare kiemen te bespeuren, terwijl ze door koken bij die temperatuur reeds in 20 à 30 min. gedood werden. Bij 33° moet deze tijd reeds verlengd worden tot meer dan een uur.

Sternberg (Manual of bacteriology New-York 1892) vond, dat de bac. fluorescens een temp. van 54° bijna 10 minuten verdraagt, daarbij niet vermeldende, welke fluorescens hij bezigde. Bovendien werkte hij vermoedelijk niet quantitatief en evenmin geeft hij op in welk medium de bacillen gesuspendeerd waren. Voor vergelijking hebben zijne cijfers dus een uiterst geringe waarde. Hij zelf meent de uiteenloopende uitkomsten, door andere onderzoekers verkregen, te moeten toeschrijven aan de individueele verschillen der culturen.

Bacillus prodigiosus.



Sternberg (l. c.) zag zijn prodigiosus bij verwarming tot 58° eerst na ± 10 min. afsterven, dat is dus een belangrijk grootere resistentie dan de cultuur vertoonde, die ik gebruikte, en die bij 48½° reeds na 10 minuten 't leven liet. De verklaring van dit verschil is hier weer als bij bac. fluorescens.

Hooger verhitten dan tot 51° hield de bacillus prodigiosus nooit langer dan 5 min. uit, en bij 52° was hij reeds binnen 1 min. afgestorven.

Door verwarming tot 41° is na 2 uur nog geen vermindering in aantal kiemen te bespeuren, terwijl bij 40° door koken reeds na 40 min. de dood is ingetreden. Bij nog lager temperatuur wordt ook in een kokende vloeistof meer dan een uur vereischt eer de laatste kiemen zijn afgestorven.

Door verhitting, met of zonder koken, bij tem-

peraturen varieerende tusschen 43° en 48°, ziet men in vrij korten tijd, ± 5 minuten, 't grootste deel der kiemen reeds bezwijken, de overblijvenden ontwikkelen zich tot kolonies, die alle verschillende kleurschakeeringen vertoonen van rood tot wit. Deze witte kolonies treden later op dan de roode, meestal eerst na 4—6 dagen kweekens bij 22°.

Wordt zoo'n witte variëteit weer op agar overgeënt en bij 22° geplaatst, dan komt na 2 × 24 uur, als de cultuur reeds vrij sterk ontwikkeld is, langzaam de roode kleur weer terug; ent men haar daarna nogmaals over, dan herkrijgt ze direct haar roode kleur. Microscopisch wijken de bacillen der witte kolonies aanmerkelijk van de roode af, zij zijn n.l. veel grooter en slanker dan de vrij korte staafjes, die de roode kleur produceeren en bovendien veel beweeglijker. Over deze witte varieteit vindt men uitgebreide mededeelingen van Schottelius (Festschrift A. v. Kölliker gewidmet. Leipzig 1887.) Hij entte van een oude gelatine-cultuur op aardappel over en zag toen alle overgangen van rood tot wit; door steeds de witte weer over te enten kreeg hij een constante variëteit. Verder zegt hij: „bij temp. van 38°—39° groeit de prodigiosuscultuur wit, doch wordt, buiten de stoof geplaatst, in 12 uur weer rood". Bij temp. van 40—45° kreeg hij blijvend witte kolonies. Volgens S. kan de prodigiosus blijvend of voorbijgaand veranderd worden.

Wasserzug (Centralbl. f. Bact. Bd 3) verkreeg de kleurlooze varieteit door den prodigiosus te kweeken in een zuren voedingsbodem, door toevoegen van wijnsteenzuur, of door te verwarmen tot 50° gedurende 5 min. Hij beschrijft deze als lange staafjes met levendige eigen-

beweging, en meent bewezen te hebben, dat coccen in bacillen over kunnen gaan.

Kübler (Centralbl. f. Bact.) kreeg overeenkomstige resultaten, maar beschouwt het optreden der bewegelijke staafjes zonder pigmentvorming als een „Entwicklungshemmung", 't geen dus overeenkomt met den vertraagden groei, dien de witte kolonies in mijne agar rolbuizen vertoonden.

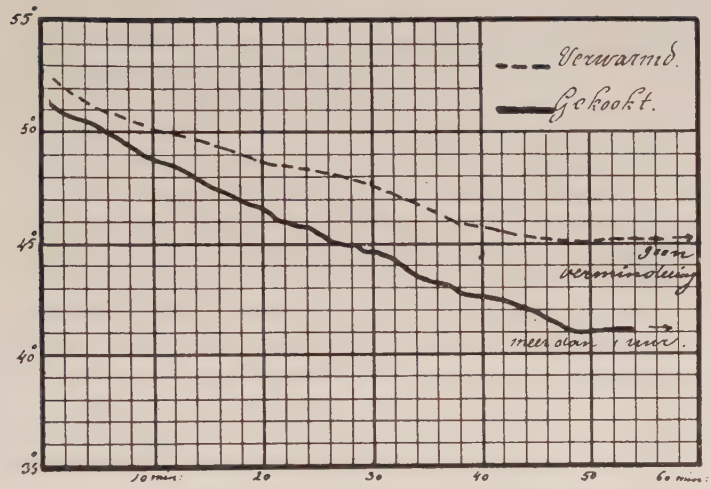
Verder vond ik de eigenaardigheid, dat de bacillen, in bouillon gekweekt bij 22°, veel resistenter waren, tegenover verwarming en koken, dan wanneer ze bij 37° waren gegroeid:

Temp.		met koken	zonder koken.
46°	Gekweekt bij 22°	10′	25′
	Gekweekt bij 37°	4′	15′
48°	Gekweekt bij 22°	5′	15′
	Gekweekt bij 37°	1′	5′

In melk gesuspendeerd blijken de kiemen eveneens resistenter, en wel:

		met koken.	zonder koken.
Temp. 46°	melk	25′	45′
	0.9 nacl.	10′	25′
Temp. 48°	melk	10′	15′
	0.9 nacl.	5′	15′

Bacillus pyocyaneus.



Hoe uiteenloopend de resultaten kunnen zijn, blijkt door de verwarmingskromme van mijn bac. pyocyaneus te vergelijken met enkele gegevens van EMMERICH en LÖW (Zeitschr. f. Hyg. 1899). Zij konden den bac. pyocyaneus $^3/_4$ uur bij 100° en $1^1/_4$ uur bij 85—90° verhitten, zonder dat hij zijn levensvatbaarheid verloor.

Een cultuur van dezen bacil werd door een Berkefeldfilter geperst, dan gedurende $^3/_4$ uur in een kokend waterbad geplaatst, daarna werd geënt op agar-agar. Reeds den volgenden dag was een intensief groen gekleurde cultuur van bac. pyocyaneus opgekomen. Zelf zijn zij blijkbaar ook verwonderd over dit resultaat: „es ist immerhin möglich, dass der Bacillus pyocyaneus bis jetzt nicht nachgewiesene Sporen bildet, welche so klein sind, dass sie durch Berkefeldfilter hindurchgehen."

Mijn cultuur vormde stellig geen sporen; bij een temp. van 53° sterft zij reeds binnen 1 min., zoowel door koken als door verwarmen. Bij een temp. van 45° zonder koken is de bac. pyoc. nog in staat zich te vermenigvuldigen, koken der vloeistof doodt hem dan reeds in ± 30 min. Bij nog lager temp. wordt veel langer koken vereischt, bij 40° ongeveer 3 uur, terwijl bij de optimum temp. 37°, na 7 uur eerst de laatste kiemen gedood waren.

In tegenstelling met prodigiosus en fluorescens verloor de pyocyaneus nooit zijn kleurproduceerend vermogen.

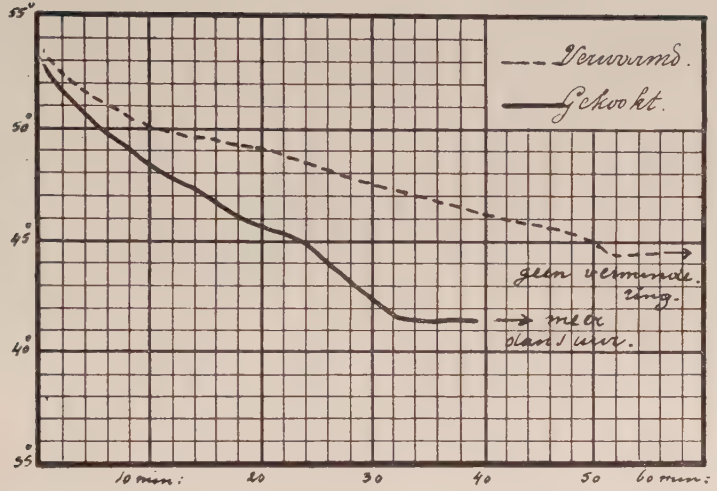
Culturen bij 22° gekweekt vertoonen in afwijking van den meer saprophytischen bac. prodigiosus minder resistentie dan die bij 37° gekweekt zijn; echter stemmen zij in zoo verre overeen, dat beide het langst weerstand bieden, wanneer ze bij hun optimum temp. gekweekt werden:

	temp.	met koken.	zonder koken.
Gekweekt bij 37°	49°	5—10′	15—20′
	47°	15—20′	30—40′
Gekweekt bij 22°	49°	5′	10—15′
	47°	5—10′	15—20′

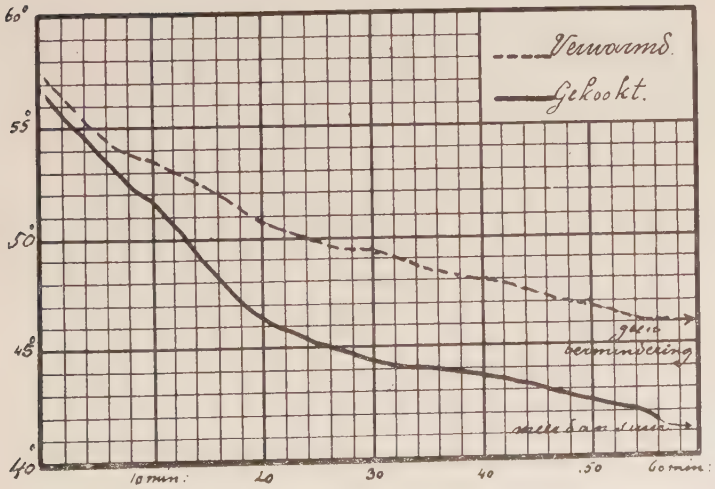
Enorm is bij deze bacillen het verschil in weerstand afhangende van het medium, waarin ze gesuspendeerd zijn. Zoo vond ik de volgende getallen:

		met koken	zonder koken.
Temp, 53°	In melk	20′	30′
	In 0.9 Nacl.	binnen 1 minuut.	
Temp. 50°	In melk	> 1 uur	> 1 uur
	In 0.9 Nacl.	6′	12′

Bacillus typhi.

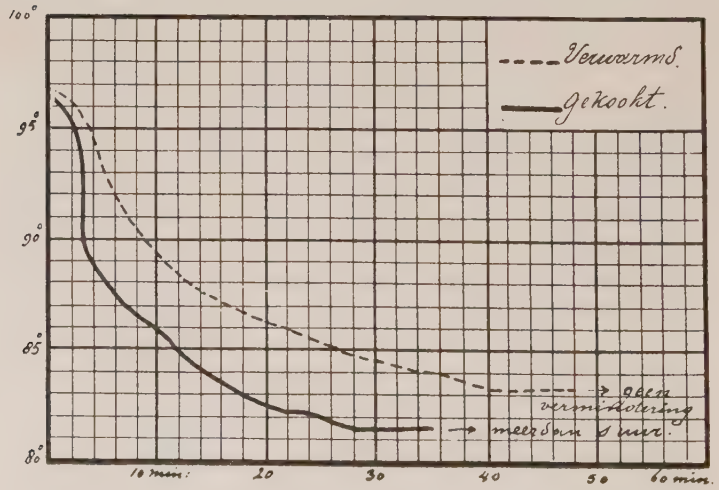


Bacillus coli.



Hoewel tegenover iedere temperatuur de bac. typhi, hetzij in een kokende of in een verwarmde vloeistof gesuspendeerd, een mindere resistentie vertoont dan de bac. coli, wil ik beide toch gelijktijdig bespreken; zij behooren bij elkaar. Bac. typhi blijkt gevoeliger te zijn voor koken dan de bac. coli, welks curve bij ± 43° een bijna horizontaal verloop gaat nemen, de eerste wordt dan nog binnen het half uur gedood. Bovendien blijkt verwarming bij een temp. van 45° voor bac. coli absoluut onschadelijk, de bac. typhi neemt dan nog in aantal af, hoewel eerst na langen tijd.

Bacillus Anthracis.



Wat den miltvuurbacil betreft, hiervan bepaalde ik alleen het weerstandsvermogen der sporen.

Bij 18° gekweekt en daarna gedurende eenige dagen

bij 37° geplaatst, blijkt de cultuur bijna uitsluitend uit sporen te bestaan. Door deze te drogen en met glaspoeder een weinig te wrijven, verkreeg ik een materiaal, waarvan ik aan kon nemen, dat het in de 14 dagen, die de experimenten duurden, weinig veranderde, des te meer daar ik ze in fijngewreven staat eerst ruim een maand bewaarde.

Zooals uit de krommen blijkt, zijn ook de sporen beter bestand tegen verwarming dan tegen koken.

Bij een temp. van 97° stierven ze op beide wijzen reeds binnen 1 minuut, daarna wijken de krommen uiteen.

Zonder koken schijnt een temp. van 83° hen ook in een uur tijds niet in 't minst te schaden; kookt 't medium, dan kan men deze grens bij ongeveer 81° leggen.

Duidelijk bleek, dat de sporen in de cultuur na verloop van tijd meer bestand worden tegen hitte en dus een zekere rijping ondergaan.

Voor de meer resistente sporen heb ik echter de curve niet gemaakt, maar mag op grond mijner proeven aannemen, dat haar vorm even als die der andere is, alleen een paar graden naar boven verschoven.

Grachtwater.

Nadat ik had vastgesteld, dat de bacteriën sneller sterven, wanneer de vloeistof kookt, dan wanneer ze enkel verwarmd wordt, en verder had geconstateerd, dat er voor iedere bacteriesoort een temperatuur bestaat, waar dit verschil 't grootst is, heb ik getracht deze temperatuur te

vinden voor een mengsel van bacteriën, zooals in gracht-water voorkomt.

Bij een temp. van 27° blijkt ook na 2 uur geen afname in kiemenaantal, noch door verwarmen noch door koken.

Gedurende 1 uur bij 47° zag ik zoowel door koken als door verwarmen het grootste deel der kiemen reeds afsterven, nog een uur later trad door verwarming geen vermindering meer op, in het gekookte water waren toen alle kiemen afgestorven.

Dit laatste resultaat meende ik echter uitsluitend te moeten toeschrijven aan het feit, dat toevallig in de genomen monsters geen sporen of thermophile bacillen aanwezig waren, want anders was het toch ondenkbaar, dat alle kiemen bij 47° in 2 uur afstierven. Immers het is bekend, dat er kiemen zijn, die zelfs het koken bij 100° meer dan 2 uur uithouden.

Dat het grootste deel reeds binnen het uur sterft is zeer goed te begrijpen; men heeft bijna uitsluitend met saprophyten te doen, de vegetatieve vormen zullen dus die verwarming niet zoo lang verdragen (zie fluorescens); verder vermindert het aantal door verwarmen niet meer, het zijn nu de sporen en thermophile bacillen die weerstand bieden.

Mijn vermoeden werd bevestigd bij een volgende proef, genomen bij een temp. van 55°. Hier bleek mij, dat zoowel door koken als door verwarmen het kiemenaantal binnen een half uur reeds tot een zeer klein deel gereduceerd was. Deze overblijvenden waren echter bestand tegen een nog twee uur voortgezet koken bij 55°.

Bij microscopisch onderzoek bleek, dat van de overblijvende kolonies (6 in getal, terwijl in de contrôle-

rolbuis zich ongeveer 80 kolonies bevonden) er vier bestonden uit sporehoudende bacillen en twee uit micrococcen.

Een groot verschil doet zich verder voor bij het kweeken der kolonies, al naar mate daarvoor agar-agar of gelatine gebezigd wordt. Ent men de proefjes in agarrolbuizen en plaatst men deze bij 22°, dan is het aantal kolonies veel geringer, en de groei veel langzamer, dan wanneer ze gekweekt worden bij 37°, daartegenover krijgt men uit hetzelfde water meer kiemen bij 22°, wanneer men ent in gelatine.

Het is trouwens bekend, dat voor waterbacteriën gelatine een betere voedingsbodem is dan agar-agar.

Melk.

Er doet zich bij het koken van melk een bezwaar voor, dat in den beginne zeer storend werkte. Werd namelijk, zooals ik gewoonlijk met keukenzoutopl. deed, de melk eerst verwarmd tot de gewenschte temperatuur en daarna onder lage drukking gebracht, dan begon ze zoo heftig te koken, dat de geheele koeler er mede gevuld werd; na ± een half uur werd het koken kalmer en vloeide alleen condensatiewater uit den koeler terug. Ook wanneer later de temp. van het waterbad veel hooger werd dan in de flesch en de luchtpomp even in werking gebracht moest worden, begon het heftige koken opnieuw.

Was de melk reeds geïnfecteerd en raakten dus kiemen in den koeler, dan kwamen ze hier onder gunstiger omstandigheden, ze vielen afgekoeld langzamerhand in de

flesch terug, en gaven dus onbetrouwbare uitkomsten. Dit alles kon ik voorkomen door reeds vóór het verwarmen de lucht in de flesch onder de gewenschte drukking te brengen en te zorgen, dat het waterbad niet te warm werd.

Mijn bedoeling met deze en de vroeger beschreven proeven met bac. pyocyaneus en prodigiosus in melk, was na te gaan of men door koken liefst bij kamertemperatuur de vegetatieve vormen zou kunnen dooden, en zoo het pasteuriseeren vervangen. De mogelijkheid om de melk geheel kiemvrij te maken, was daarbij, om redenen, reeds bij het grachtwater aangevoerd, natuurlijk uitgesloten.

De kiemen, die in de melk zich bevinden afkomstig van de uiers der koe, van de handen der melksters, van 't vaatwerk, verminderen ook door eenvoudig verwarmen bij ± 55° reeds vrij spoedig, doch evenals in grachtwater blijven er ook na uren nog enkele over. De rolbuizen — in dit geval geeft gelatine eveneens de beste resultaten — kunnen in de eerste dagen wel steriel schijnen, steeds ziet men na een dag of zes nog enkele kolonies opkomen.

Wanneer we echter nagaan, dat de bacillus pyocyaneus in resistentie tegenover warmte niet veel ten achterstaat bij de andere door mij onderzochte pathogene bacillen, voor zoover het de vegetatieve vormen betreft, en dat deze bacil in melk gedurende 30 min. bij 53° verwarmd reeds afgestorven is, dan is een verwarming bij 70°, zooals bij het pasteuriseeren geschiedt, zeer zeker meer dan voldoende, om de vegetatieve vormen der schadelijke kiemen te dooden; voor het dooden der sporen is deze temperatuur onvoldoende, waarschijnlijk zouden ze dan

wel door koken gedood kunnen worden, doch eerst na langen tijd.

Om melk geheel kiemvrij te maken, zou men ze gedurende langen tijd bij 100° moeten koken.

Vergelijkt men melk, die bij 70° gedurende een kwartier gekookt is met even lang en even hoog verwarmde melk, dan treedt een groot onderscheid op. In de eerste plaats in de gekookte geen spoor van vliesvorming, tenzij men onmiddellijk na het koken de melk in een open vat uitschenkt en in de tweede plaats blijkt door toevoeging van H_2O_2 en Joodkalistijfsel, het enzym (Babcock), dat de zuurstof van de eerste op de laatste overdraagt en daardoor de melk blauw kleurt, vernietigd te zijn, terwijl de verwarmde melk dan nog intensief gekleurd wordt.

Wat de vliesvorming betreft:

Russel en Hastings (Centr. bl. f. Bact. und Parasitenkunde 1902) wezen er op, dat bij verwarming van melk in een gesloten vat bij ± 60° geen vlies optreedt, in een open vat echter wel, en verder toonden zij aan, dat de tuberkelbacil resistenter was in melk, verhit in een open, dan in een gesloten vat; zij schrijven de oorzaak daarvan toe aan het vormen van het vliesje. Een thermophile micrococcus, uit gepasteuriseerde melk gekweekt, was in een gesloten vat bij 76° na 12 min. afgestorven, in een open vat in denzelfden tijd nog niet bij 80°; onder het vliesje blijkt de melk ook in het open vat reeds na 12 min. bij 76° reeds steriel te zijn.

Wat de oorzaak dezer grootere resistentie betreft, deze kan tweeërlei zijn: lagere temp. van het vliesje, of de beschuttting door het vliesje zelf. Om de eerste mooglijk-

heid uit te sluiten lieten R. en H. eerst een vlies vormen, dit werd weggenomen en overgebracht in water van 76°, hierin zonk het en ze lieten het er vijf tot acht minuten in; toen bleek een veel grooter deel, hoewel niet alle kiemen afgestorven.

Op grond van het feit, dat ook in het vliegje onder water alle kiemen niet afsterven, meenen R. en H. tot het besluit te mogen komen, dat de lagere temperatuur van het vliesje niet de oorzaak is van den grooteren weerstand der microben, maar wel het mindere watergehalte.

Met hun conclusie kon ik mij echter niet vereenigen.

Zooals blijken zal uit de desinfectieproeven met verzadigden stoom, doodt deze de bacillen en sporen veel eerder dan koken bij dezelfde temperatuur en zoo zal dus ook hier het mindere watergehalte van 't vliesje eerder nadeelig dan voordeelig zijn voor het levensbehoud der kiemen en bovendien, eerst laten zij bij 76° een vlies vormen en doen daarna dat vliesje gedurende 5 à 8 minuten in water van dezelfde temp. waardoor het op den bodem zinkt. Wanneer men nu bedenkt, dat zulk een vliesje reeds vrij spoedig gevormd wordt, dat de oppervlakte van dat vliesje een aanmerkelijk lagere temp. moet hebben dan de melk daaronder, dan is het niet te verwonderen, dat een verblijf van 5 à 8 minuten in water van diezelfde temp. niet alle kiemen doodt.

Mijns inziens berust het grootere weerstandsvermogen alleen op de lagere temperatuur van het vliesje.

Hoe de verklaring ook zij, het blijkt wel, en daarover is men het wel eens, dat in het vliesje de bacteriën langer

stand houden, dat men de vorming hiervan dus moet beletten door te koken of door te verwarmen in een gesloten vat.

De verdere voordeelen van het koken der melk zijn, dat het de microben sneller doodt, dat men de kiemen dooden kan bij temperaturen, waarbij ze door eenvoudige verwarming niet sterven; hier tegenover staat echter 't nadeel, dat koken een chemische verandering moet te weeg brengen, zooals later bewezen zal worden.

En bovendien kan men door een paar graden hooger te verwarmen hetzelfde effect bereiken in even langen tijd.

Mijn oorspronkelijke verwachting, dat het koken bij lage drukking in de praktijk het pasteuriseeren met voordeel zou kunnen vervangen is dus niet vervuld geworden.

Zooals bekend en dus te verwachten was, blijkt ook uit bovenstaande waarnemingen, dat er een groot verschil bestaat in weerstandsvermogen tegenover warmte tusschen saprophyten en parasieten, en bovendien vertoonen de saprophyten zoowel als de parasieten ook onderling vrij uiteenloopende temperatuur-krommen van het afsterven, althans wat absolute hoogte betreft.

En ook voor dezelfde bacteriesoort vond ik verschillende resistentie afhangende van het medium, waarin ze gesuspendeerd waren; van de temperatuur, waarbij ze werden gekweekt; van den ouderdom der cultuur, waaraan het materiaal was ontleend. In melk bieden de microben veel langer weerstand aan warmte, dan in keuken-

zoutoplossing; bac. prodigiosus en pyocyaneus waren het meest resistent, wanneer ze bij hun optimum temperatuur waren gekweekt; de miltvuursporen aan een jonge cultuur ontleend, stierven veel eerder, dan wanneer de cultuur eenige weken oud was geworden.

Ten slotte groote individueele verschillen. Vooral bij de kookproeven trad dit duidelijk te voorschijn; binnen $^1/_4$ van den tijd, benoodigd om alle kiemen te dooden, is reeds $^9/_{10}$ afgestorven, de overblijvende blijken veel resistenter te zijn. Bij verwarming is dit verschil minder duidelijk, het aantal levensvatbare kiemen neemt daar meer geleidelijk af. Wanneer men dus de kromme van de overlevenden zou willen construeeren, dan zou deze in de eerste minuten steil naar beneden loopen, om daarna een meer horizontaal verloop te nemen.

Aan het afsterven gaat een periode vooraf, waarin de microben nog levensvatbaar zijn, doch een vertraagden groei vertoonen; bij miltvuursporen duurde het, bij 37° gekweekt, vaak meer dan twee dagen, eer kolonies zichtbaar werden, terwijl ze normaal reeds binnen 24 uur opkomen. De saprophyten, bac. prodigiosus en fluorescens vertoonden, bij 22° gekweekt, na 2×24 uur steeds goed zichtbare kolonies, een kortstondige verwarming met of zonder koken verlengde dezen tijd tot 4 à 6 dagen.

Het bleek mij verder, dat het bij de hoogere temperaturen, weinig uitmaakt of het medium kookt, dan wel eenvoudig verwarmd wordt tot denzelfden warmtegraad; dit kan ook niet anders, daar de tijden te kort worden om nog een duidelijk onderscheid te kunnen constateeren.

Grooter wordt daarentegen het verschil bij lagere temperatuur.

Er bestaat voor iedere der door mij onderzochte bacteriën een grens, waarbij ze door verwarming niet worden gedood, of althans eerst na uren, terwijl ze dan door koken reeds vrij spoedig afsterven.

Zoo gelukte het mij de vegetatieve vormen der microben te dooden bij een temperatuur, waarbij ze in gewone omstandigheden zich nog vermenigvuldigen. Debac. pyocyaneus kon b.v. zelfs bij 37° door koken gedood worden, al duurde deze executie ook 7 uur.

Nog duidelijker wordt het effect van het koken door de volgende proef. Bij 40° kan men een suspensie van bac. pyocyaneus door gedurende drie uur te koken nog niet geheel dooden, hoewel het aantal kiemen sterk verminderd is. Ik liet nu eerst het luchtreservoir zoover leeg zuigen, dat de druk met een kookpunt van 37° overeenkwam. Dan werd de suspensie tot 40° verwarmd, terwijl het reservoir uitgeschakeld was. Door nu de kraan, die daarheen voerde, te openen werd plotseling de druk verlaagd, en begon de inhoud der flesch heftig te koken. Een paar minuten later werd de kraan gesloten en door een weinig lucht in te laten steeg de druk en daarmede de temperatuur weer. Dan werd de druk weer plotseling verlaagd, enz.

Op deze wijze, waarbij dus de temperatuur schommelde van 37—40°, kon ik den bac. pyocyaneus dooden in anderhalf uur.

Vergelijkt men voor de vegetatieve vormen de krommen betreffende koken en verwarmen, dan blijkt de weerstand tegenover verwarming met het stijgen der temperatuur

regelmatig af te nemen; de lijn is vrij wel recht. Slechts bij de hoogere temperaturen wijkt de curve eenigszins af, daar heeft een graad verhooging minder invloed, ze loopt daar dus steiler; even boven het physiologische maximum, de bovenste temperatuurgrens, waarbij de microbe zich nog juist kan vermenigvuldigen, geeft een graad verhooging of verlaging der temperatuur een vrij groot tijdsverschil, hier neemt de curve een meer horizontaal verloop; bij nog lager temp. daalt de kromme, althans binnen den door mij waargenomen tijd, niet meer.

En nu de vergelijking tusschen verwarmings- en kookkromme.

Het duidelijkst spreekt het verschil tusschen koken en verwarmen in de krommen van bac. fluorescens op blz. 16; bij de andere microben is dit verschil minder sprekend, maar valt in denzelfden geest uit.

Het koken heeft dus voor alle bacteriën niet evenveel, misschien niet denzelfden invloed, doch steeds worden ze door koken sneller gedood, dan door verwarmen.

Terwijl de verwarmingskromme bij alle bacteriën even boven het physiologische maximum reeds een horizontale richting neemt, daalt de kookcurve dan nog duidelijk, en eerst tusschen maximum en optimum verandert deze van directie, doch wordt nooit geheel horizontaal. Voor zoover ik heb nagegaan, gelukt het binnen physiologische grenzen steeds de microben door koken te dooden.

Beide lijnen voor koken en verwarmen ziet men bij de hoogste temperaturen, waaraan de kiemen niet langer dan 1—5 minuten weerstand kunnen bieden, wel niet samenvallen maar toch in elkanders onmiddelijke nabijheid verloopen. Steeds sterven de kiemen echter eerder bij koken.

Wanneer we nu na de kromme voor de vegetatieve vormen verkregen, de verwarmings- en kookcurve voor sporen nader beschouwen, dan springt direct in het oog, dat de kookcurve hier weer hetzelfde type vertoont, maar dat de verwarmingskromme in plaats van meer rechtlijnig te verloopen, daarmede in vorm nagenoeg overeenstemt. Ook voor de sporen geldt weder, dat zij eerder door koken afsterven, dan door verwarming bij dezelfde temperatuur. Daarna wijken ze meer uiteen.

Het zou hier de plaats zijn, om na te gaan, wat de verklaring van de werking van het koken kan zijn, maar alvorens hiertoe over te gaan, wil ik eerst mijn proeven over sterilisatie door stoom bij lage drukking bespreken; we zullen later zien, in hoeverre ze ons den weg kunnen wijzen bij het zoeken naar die verklaring.

HOOFDSTUK II.

PROEVEN OVER STERILISATIE DOOR STOOM BIJ LAGEREN DRUK.

Rubner zegt (Hyg. Rundsch. April 1899), dat er toen ter tijde nog geen voldoende proeven over dit onderwerp gepubliceerd waren en deed daarom zelf een uitgebreid onderzoek; niet alleen beproefde hij de desinfecteerende kracht van verzadigden stoom bij verschillende temperatuur, zoowel beneden als boven de 100°, maar verder die van onverzadigden stoom en van mengsels van stoom en lucht; daarna bespreekt hij de oorzaken van den dood der microben door blootstelling aan stoom.

Wat de werking van verzadigden damp op miltvuursporen bij temperaturen beneden 100° betreft, zegt hij: „Die Versuche zeigten, dass Dampf von niederer Temperatur als 100° z. B. 95° nur wenig, aber immerhin deutlich, in seiner Wirksamkeit hinter dem Dampf von 100° zurücksteht. Erheblicher werden die Differenzen bei 90°.

Wenn Milzbrandsporen in Dampf von 100° in einer Minute absterben, so wirkt Dampf von 90° erst in 12 Minuten. Trägt man die Zeiten der Desinfection als Ordinaten, die Temperaturen als Abscissen auf, so erhält man eine Kurve, welche unter 95° sich ziemlich steil zu 90° hebt. Auch bei Sporen einer saprophytischen Art ergaben sich dieselben Verhältnisse."

Tegen de methode van RUBNER heb ik echter bezwaren. In de eerste plaats heeft hij, voor zoover uit zijn artikel blijkt, niet quantitatief gewerkt, en verder zijn de zijden draadjes, hoewel ze voordeelen aanbieden door hun geringe massa zeer ongeschikt, 't is immers onmogelijk alle kiemen er uit te krijgen en in agar te verdeelen; in de cultuur zal men dus niet kunnen zien of het draadje nog één, tien of honderd levende kiemen bevatte, 't geen toch van groote waarde is.

Toen ik dus naar aanleiding van de reeds vroeger besproken vraag begon met mijn onderzoek naar de desinfecteerende kracht van verzadigden stoom bij temp. van 100° en daar beneden, heb ik getracht de fouten van RUBNER zooveel mogelijk te vermijden, en verder bedacht ik een inrichting, waardoor het evenals bij de kookproeven mogelijk was achtereenvolgens na verschillende tijden monsters te nemen; het toestel van RUBNER leende zich daartoe niet.

BESCHRIJVING VAN HET TOESTEL.

Zooals plaat II aangeeft, bestaat het apparaat uit een metalen cylindrisch vat, dat op $^1/_3$ der lengte omgebogen is, en waarvan 't bovenste deel een hoek van $\pm$ 135° met 't onderste deel maakt.

De cylinder staat op een drievoet en is geheel met een dubbele, warmte isoleerende laag bekleed. Juist in de bocht is een thermometer geplaatst; 't open einde kan door een caoutchouc stop gesloten worden. In deze stop zijn twee gaten geboord. Door de eene voert een glazen buisje (*a*) naar den koeler en van daar evenals bij het vorige toestel naar manometer, luchtreservoir en waterstraalluchtpomp. Het tweede gat dient om een koperen staaf door te laten, die er juist in past en naar binnen kan geschoven worden zonder lucht door te laten. In de staaf zijn, zooals de teekening aangeeft, zes gaten geboord op gelijke afstanden, zoo groot, dat bij het naar binnen schuiven telkens 1 gat ongeveer 3 cM. buiten de stop in den cylinder zich bevindt, 't daaropvolgende is dan in de stop, weer een volgende er vlak voor.

Door nu telkens de staaf een gat verder te schuiven, kon ik de sporen, die in de gaten geborgen waren, gedurende verschillende tijden aan den stoom blootstellen.

Evenals Rubner gebruikte ik als proefobject miltvuursporen. Een suspensie hiervan in steriel water, waarin per mM^3. ongeveer 30 kiemen waren, werd met een platina-lis op uiterst dunne mica-plaatjes, van 6 mM. doorsnede, gedruppeld; alle plaatjes bevatten, zooals gecontroleerd werd, nu ongeveer 100 kiemen. Deze werden daarna gedroogd en vervolgens gepakt tusschen

twee schijfjes filtreerpapier, wier middellijn ongeveer 't dubbele was, daarna werden deze aan den rand met collodium aan elkaar gelijmd en de bedruppelde zijde van het micaplaatje door een streep anilinepotlood op het papier aangegeven. Hierdoor wist ik na afloop der proef, aan welke zijde de sporen zich bevonden. De aldus vervaardigde etui paste juist in de gaten van de staaf, zonder er echter bij schudden uit te vallen.

Bij 't begin der proef werd de staaf dus geladen met dergelijke testobjecten en daarna in de stop geschoven tot het tweede gat er nog juist even buiten was. 't Eerste zat dus nog in de stop. Dan werd het water, dat zich in het verticale deel bevond, aan het koken gebracht, en de temperatuur en druk op de gewenschte hoogte constant gehouden, op een wijze, zooals bij de kookproeven reeds werd aangegeven.

Door den hoek, dien de twee deelen van den cylinder met elkander vormen, kon het spattende water de staaf en de zich daarin bevindende etui's niet nat maken, waardoor de inwerking van den stoom gewijzigd zou worden.

Zoodra nu 't water uit den koeler terugvloeide en een stukje glas op den bodem van den cylinder gelegd, door het tikken aangaf, dat het water kookte, werden achtereenvolgens met verschillende tusschenpoozen de verschillende micaplaatjes in den stoom gebracht. In den beginne was hierbij nog een kleine moeilijkheid te overwinnen en wel deze. Door de uitstraling van het deel der staaf, dat nog buiten de stop was, werd het deel in den cylinder afgekoeld, er had condensatie plaats en de filtreerpapiertjes kwamen doornat te voorschijn na afloop der proef. Hierdoor werden niet alleen de omstandigheden gewijzigd,

maar bovendien werden de sporen van het plaatje afgespoeld. Voortdurende verwarming der staaf buiten de stop met een kleine vlam overwon dit bezwaar.

Evenals bij de proeven met koken en verwarmen, werd ook bij deze weder van agar-rolbuizen gebruik gemaakt.

Met twee steriele pincetten werd het etuitje geopend, het micaplaatje in de agar gebracht en met een platina-lis de sporen er af gewreven.

Op deze wijze gelukte het bijna altijd de plaatjes geheel van kiemen te ontdoen, het was een zeldzaamheid als er nog een kolonie op te voorschijn kwam; een groot voordeel dus boven de gewoonlijk voor dergelijke proeven gebezigde zijden draadjes.

B. *Resultaten.*

Mijn proeven over sterilisatie door stoom bij lage drukking strekten zich hoofdzakelijk uit over sporen van bacillus anthracis en bovendien experimenteerde ik enkele malen met bac. pyocyaneus.

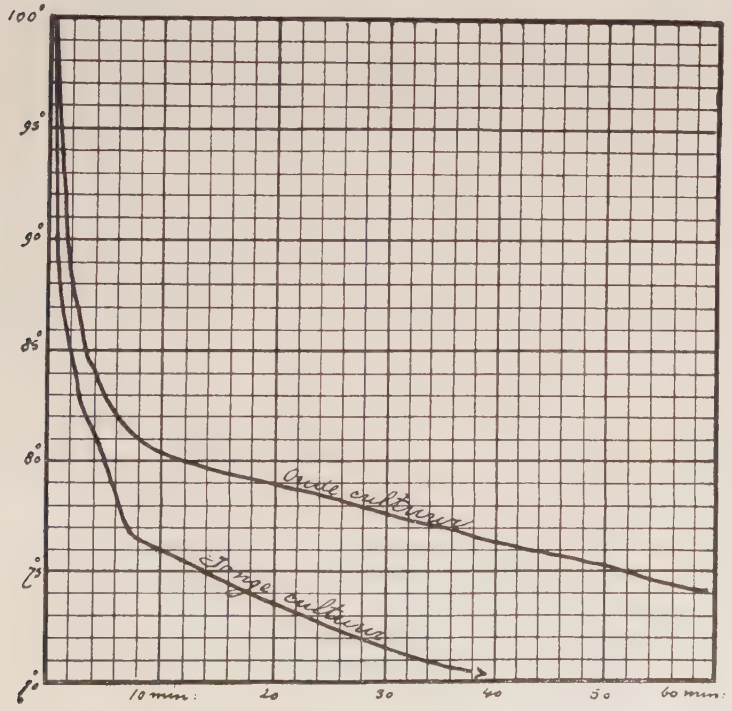
In de eerste plaats deed ik proeven met miltvuursporen en wel gebruikte ik hiervoor sporen van een oude en van een jonge cultuur, wier verschil in resistentie reeds uit de kookproeven gebleken was. Volledigheidshalve geef ik hieronder de uitkomsten in een tabel weder.

Geen levensvatbare kiemen waren meer aanwezig bij:

Temperatuur.	Jonge cultuur.	Oude cultuur.
100°	—	$^1/_3'$
98°	—	$^1/_2'$
96°	$^1/_4'$	$^1/_2'$
94°	$^1/_4'$	$^3/_4'$
92°	$^1/_4'$	$1^1/_4'$

Temperatuur.	Jonge cultuur.	Oude cultuur.
90°	1/4′	1 1/4′
88°	1′	2 1/4′
86°	1 1/4′	3′
85°	1 3/4′	—
83°	2 1/4′	4 1/2′
81°	4′	8′
80°	—	12′
79°	5′	—
78°	6′	25 à 30′
76°	10′	
75°	14′	
73 1/2°	20′	> 1 uur
71°	30 à 40′	

Hieronder zijn dezelfde gegevens graphisch voorgesteld:



Bovenstaande krommen zijn gemaakt op een wijze, als bij de proeven over koken en verwarmen is aangegeven, met dit verschil, dat het nu mogelijk was, ook tijden van minder dan 1 minuut te nemen. Hier dient echter nog opgemerkt, dat ik in tegenstelling met RUBNER, de tijden op de abscisas, de graden op de ordinaatas aangaf, evenals dat ook bij de krommen in het vorige hoofdstuk is geschied.

Zooals bij de lijnen staat aangegeven, geldt de eene voor materiaal aan een jonge cultuur ontleend, de andere voor sporen van diezelfde cultuur, die inmiddels ± 1 maand ouder was geworden.

Bij temperaturen tusschen 90 en 100° geeft een graad verschil bijna geen verandering in 't oogenblik van afsterven.

Eerst beneden 90° worden bij de oude cultuur de tijden langer (± 2 min.), de sporen van jongeren datum sterven ook dan nog in zeer korten tijd (½ min).

Stelt men de uitkomsten, door RUBNER verkregen, evenéens door een lijn voor, dan zou zij ongeveer denzelfden vorm hebben, maar in haar geheel hooger liggen; zijn materiaal moet resistenter geweest zijn, bij 90° werd reeds 12 min. vereischt om de laatste sporen te dooden.

Evenals bij 't koken, was ook bij deze proeven in korten tijd reeds 't grootste deel der kiemen afgestorven de overblijvende geven dus als 't ware den vorm aan de kromme.

Toen ik nu mijn uitkomsten, met stoom verkregen, vergeleek met de resultaten der kookproeven, bleek, dat door stoom de sporen eerder afstierven, dan door koken bij dezelfde temperatuur, en hoewel 't onwaar-

schijnlijk was, moest ik toch eerst nagaan, of wellicht het drogen op de micaplaatjes hiervan de oorzaak was.

Hiervoor nam ik een kookproef, waarbij de flesch geinfecteerd werd met dezelfde micaplaatjes, zooals ik voor de stoomproeven gebruikte. Het resultaat was, dat ze ook bij deze behandeling langer in kokend water bleven leven dan in den stoom.

Nu was 't dus nog de vraag, is ook bij lagere temperaturen de stoom in staat, vegetatieve vormen te dooden, even snel of sneller dan ze door koken afsterven?

Bac. pyocyaneus was ook in dit geval zeer goed te gebruiken. Snel uitdrogen op micaplaatjes deed, zooals ik vooraf controleerde, binnen 12 uur geen schade; het aantal levensvatbare kiemen werd hierdoor niet merkbaar verminderd. Bovendien werden de proeven in stoom en door koken onmiddelijk na elkander genomen en na afloop der beide proeven een contrôle-rolbuis gemaakt, waarin een plaatje, dat aan geen van beide behandelingen was blootgesteld.

Het bleek nu bij 45° en 48° dat bac. pyocyaneus sneller gedood wordt door verzadigden stoom, dan door koken in physiol. keukenzoutsolutie. Daarom wilde ik nog verder gaan en stelde ze bloot aan stoom van 34°, en ook hier was de uitkomst juist dezelfde.

Hier laat ik een paar tabbellen volgen, waarin de tijden voor stoom en koken zijn aangegeven, in de eerste plaats voor miltvuursporen van drieërlei resistentie, en vervolgens voor een pyocyaneuscultuur.

Miltvuursporen.

Temperatuur.	Stoom.	Koken.
I. 87°	< 3′	5—10′
II. 85°	2′	10—15′
III. 80°	5′	> 1 uur

Bac. pyocyaneus.

Temperatuur.	Stoom.	Koken.
45°	< 10′	25 à 30′
48°	< 5′	10 à 15′
34°	45′	meer dan 7 uur.

Alvorens verder te gaan wil ik hier nog vermelden, wat Rubner (l. c.) mededeelt over het afsterven der sporen door stoom.

Het was bekend, dat waterdamp energieker werkt dan droge lucht van zelfs hoogere temperatuur. Een afdoende verklaring was echter nog niet gegeven. Sommigen meenden, dat het water de hitte hielp binnendringen, door ingedroogde stoffen, die de kiemen omhullen, zoomede den sporewand week en doorgankelijk te maken voor

warmte. Met Rubner komt ons deze verklaring, welke geen rekening houdt met de uiterst geringe afmetingen der microben, wat gedwongen voor; veel meer is hij geneigd een verklaring op chemisch gebied te zoeken, en daarbij heeft hij in de eerste plaats het oog op 't eiwit der cellen :

„Door de aanwezigheid van water komt coagulatie veel sneller tot stand dan door droge hitte, daargelaten of in beide gevallen het proces hetzelfde is.

Bij bacteriën hebben wij geheel ongelijke toestanden van het watergehalte; het frissche vegetatieve materiaal is buitengewoon waterrijk, gedroogd bacteriepoeder kan $^1/_4$ of $^1/_5$ water bevatten. Het armst aan water zijn de sporen, waarop de wijze van ontstaan en de optische eigenschappen duiden."

De weerstand tegenover droge hitte zou dus voor sporen verklaarbaar zijn door hun waterarmoede, waardoor coagulatie onmogelijk is, zij staan alleen bloot aan de ontledende werking der droge warmte. Het sneller sterven door stoom zou dan daarop kunnen berusten, dat ook hygroscopisch gebonden water de coagulatie door warmte bevordert. — R. overtuigde zich, dat eier-eiwit door inwerking van waterdamp zeer snel onder geringe volumevermeerdering (18 à 20 %), maar zonder verandering der optische uitwendige eigenschappen, onoplosbaar wordt, terwijl eiwit met 7 % watergehalte door droge hitte van 150° in een uur niet geheel onoplosbaar in water wordt.

„Deze coagulatie nu is voldoende om de doodende werking van den stoom te verklaren, maar daardoor is nog niet bewezen, dat dit 't eenige proces is, dat door den damp tot stand komt."

Dat bij coagulatie door stoom de moleculen water in zich opnemen, bewees R. door gewichtsbepalingen als niet het geval te zijn. Bij desinfectie door stroomenden waterdamp had men tot dien tijd (1899) in tegenstelling met droge verhitting een geheel intact blijven der objecten, die gedesinfecteerd moesten worden, aangenomen. Dit was hoogst onwaarschijnlijk. — R. toonde 't eerst aan, dat verwarming van organische stoffen in water tot 100° tot chemische veranderingen aanleiding kon geven; als splitsingsproducten werd daarbij gevonden: koolzuur, zwavelwaterstof en mercaptan, dezelfde, die ook optreden door droge oververhitting. Hoe droger de substantie, des te moeilijker verkrijgt men door verhitting deze splitsingsproducten.

„Wir gehen also auch wohl nicht fehl, wenn wir chemische Umsetzung und desinficirende Wirkung uns in einem näheren Zusammenhange denken; und wir erkennen auch mit vollster Klarheit, dass das Wassermolekül eine ungemein wichtige Rolle bei dieser Umsetzung spielt. Der Sauerstoff der Luft scheint für die Desinfectionsvorgänge im engeren Sinne ziemlich oder ganz belanglos zu sein, der Sauerstoff des Wassermoleküls, der in der Bildung als hygroskopisches Wasser den durch Wärmebewegung gelockerten organischen Verbindungen nahe liegt, stellt eine aggressive Substanz dar."

Uit het volgende hoofdstuk zal blijken, in hoeverre de resultaten van mijn proeven hiermede in overeenstemming zijn.

HOOFDSTUK III.

OVER DE VERKLARING VAN DEN INVLOED VAN HET KOKEN EN VAN HET STOOMEN.

Waarom sterven de microben zooveel eerder in een kokende vloeistof dan wanneer het medium tot dezelfde temperatuur verwarmd wordt?

De verschillende factoren, die hierbij in aanmerking genomen moeten worden, zijn:

Allereerst de temperatuur. Deze is wel is waar in beide gevallen, koken en verwarmen, steeds gelijk genomen en men zou dus kunnen meenen, dat de invloed daarvan op die wijze was uitgesloten. Het is echter denkbaar, dat de werking van het koken bij de eene temperatuur — afgescheiden van den directen invloed dezer op de microben — krachtiger is, dan bij de andere; en dit is werkelijk zoo, anders is het niet te verklaren, hoe in de nabijheid van het physiologisch optimum een graad verschil den tijd, benoodigd om de kiemen te

dooden, zooveel kon verlengen of verkorten, zooals blijkt bij bac. pyocyaneus en bij bac. fluorescens.

't Was in de tweede plaats mogelijk, dat de kiemen stierven door gebrek aan zuurstof; immers bij 't koken wordt alle lucht uit het water verdreven, en door waterdamp vervangen, zooals mij uit een eenvoudige proef bleek.

Ik bracht de vloeistof eenigen tijd aan 't koken, en sloot toen de afvoerbuis naar den manometer en naar den koeler, tegelijkertijd de vlam onder 't waterbad verwijderende. Na afkoeling van de flesch B werd een buis geopend, die met de kraan K verbonden was, en in een bak met water uitmondde. De flesch werd geheel vol water gezogen.

Ten einde nu uit te maken, of zuurstofgebrek de oorzaak van den dood was, werd een kolfje, voor de helft gevuld met 0.9 Nacl, waarbij een bouillonsuspensie van Bac. pyocyaneus, met de zuigpomp verbonden en daarna gekookt in een waterbad, bij hoogstens 30°, gedurende enkele minuten.

Onder 't koken, wanneer ik aan kon nemen, dat alle lucht verdreven was, werd de uitgetrokken hals met de steekvlam dicht gesmolten. Het aldus behandelde kolfje (no. 1) werd dan gedurende eenige uren in de stoof bij 37° geplaatst; daarnevens twee contrôle-kolfjes (no. 2 en 3) beide eveneens voor de helft gevuld met de oorspronkelijke suspensie. De inhoud van no. 2 was even gekookt bij 30°, doch daarna met een wattenprop gesloten, terwijl no. 3 direct zonder eenige behandeling in de stoof werd gezet, evenals no. 2. Om te zien hoe groot 't aantal kiemen in de oorspronkelijke suspensie was, werd bij het begin der proef hieruit een rolbuis gemaakt. De uitkomst dezer proef was, dat na afloop der proef een

rolbuisje zoowel uit het open gelaten als uit het dicht gesmolten kolfje eenige, doch geringe vermindering in kiemenaantal vertoonde.

Het was dus duidelijk, dat zuurstofgebrek niet de oorzaak was van 't sterven van den bac. pyocyaneus, wanneer deze gedurende 7 uur gekookt werd bij 37°, evenmin kon dat op rekening gesteld worden van het langdurig verblijf in 0.9 nacl. solutie.

De vermindering van 't aantal levensvatbare kiemen in beide kolfjes, meen ik te moeten toeschrijven aan 't weinige voedsel, dat de bacillen gedurende hun verblijf in de keukenzout-oplossing hebben. Bij deze proef toch had ik de oplossing in verhouding van ongeveer 1 : 75 geïnfecteerd met een cultuur der bacillen in bouillon. In deze meening werd ik versterkt, toen ik bij een volgende dergelijke proef in plaats van een bouilloncultuur te gebruiken, eenvoudig met een platinaoog een weinig van een agarstrijkcultuur afstreek en dit in de keukenzout-oplossing verdeelde.

Twee rolbuisjes direct na de infectie geënt, waren na 24 uur als 't ware één kolonie, terwijl de rolbuizen uit de kolfjes na afloop van de proef gemaakt, geheel steriel bleven.

Ik besloot nu de stikkingsproef op groote schaal te herhalen, met bac. prodigiosus, pyocyaneus en coli, en wel tegelijkertijd bij 43° en bij kamertemperatuur. Het resultaat was, dat geen der culturen (suspensie van bouilloncultuur in physiol. keukenzoutopl.) gedood werd.

Dit resultaat stemt dus volkomen overeen met de meening van R., dat de zuurstof uit de lucht geen of althans een zeer ondergeschikte rol speelt.

Trouwens a priori was 't niet waarschijnlijk, dat de

bacillen door stikking stierven, want hoe zou 't dan te verklaren zijn, dat de bac. pyocyaneus bij 40° in 3 uur, bij 37° eerst in 7 uur gedood werd, beide temp. zijn voor den bacil bij uitstek geschikt en bovendien, hoe was 't dan mogelijk, dat zij zich in melk zooveel resistenter toonden dan in physiol. keukenzoutsolutie. En verder, de culturen in een laboratorium worden bewaard in luchtdicht afgesloten reageerbuizen, dikwijls blijven zij zoo maanden, ja jarenlang in leven. 't Was echter denkbaar, dat een combinatie van zuurstofgebrek en warmte ze deed sterven, dit is nu door onze daareven medegedeelde proeven uitgesloten.

Een derde verklaring was mogelijk voor 't afsterven van de microben in een kokende vloeistof, zelfs bij een temperatuur, waarbij ze normaliter niet alleen blijven leven, maar zelfs zich nog vermenigvuldigen. De mechanische beweging door de opstijgende dampbelletjes kon reeds voldoende zijn om de kiemen te dooden.

Horvath (Pfl. Archiv. 1878) was de eerste, die door mechanische beweging, door schudden in een schudmachine, bacteriën heeft gedood; na hem hebben tal van onderzoekers met verschillende wijzigingen en met even wisselende resultaten deze proeven herhaald. Een duidelijk overzicht hiervan geeft Meltzer (Archiv. f. Biologie 1894), aan wien wij het navolgende ontleenen.

Toen ter tijde was men het niet eens of beweging schade deed of niet, maar bovendien was de vraag, wat is eigenlijk het nadeel der beweging.

Zoo meende Reinke (Pfl. Archiv. 1880), dat de beweging als 't ware ingreep in de moleculaire beweging van het levende protoplasma en hierdoor schade deed. Hij

meende, dat daarvoor de schudmachine te grove stooten gaf, en verbond daarom een glaasje met geinfecteerde vloeistof aan een metalen staaf, die daarna met een strijkstok in trilling werd gebracht. De groei werd vertraagd, maar de kiemen werden niet gedood.

Tumas (med. Wochenschr. 1882 Petersburg) behoort tot de andere partij.

Volgens hem is volkomen rust nadeelig en hij vindt de beweging een voortreffelijk middel voor de ontwikkeling der lagere organismen, zij zou de opname van zuurstof bevorderen en 't verwijderen van schadelijke gassen vergemakkelijken.

Roser, Hansen, Buchner, Cramer, Leone, Gärtner Hoppe-Seyler, allen deden in dezen tijd (1880—1890) onderzoekingen, op verschillende wijze schuddend en met verschillende suspensies, allen komen tot de slotsom, dat beweging gunstig werkt of althans niet schadelijk.

Aan de andere zijde staan Wernicke, Pöhl, Frankeland, die duidelijk vermindering in kiemenaantal vonden.

Bern. Schmidt (Archiv. f. Hygiene 1898) vond voor enkele bacillen geen nadeel, voor andere bleek het schudden fataal te zijn o.a. voor vibrio cholerae en bacill. typhi; vertraagde groei, minder kolonies, was 't gevolg.

Meltzer (l.c.) tracht de tegenstrijdigheid dezer resultaten op te heffen, „zij vullen elkaar aan," zegt hij, „slechts langdurige sterke beweging kan de microörganismen in hun groei belemmeren of ze dooden; dat daarentegen een zachte beweging bevorderend op de ontwikkeling werkt, is volstrekt niet hiermee in strijd."

Wel vonden enkelen met krachtig schudden ook geen

vermindering, doch dan was wellicht de flesch, die bewogen werd, geheel gevuld, zoodat de vloeistof daar binnen slechts weinig bewoog; hetgeen natuurlijk een heel ander resultaat moet geven, dan wanneer ze slechts voor $^1/_3$ gevuld is en de inhoud dus heen en weer geslingerd wordt.

Meltzer deed zijn proeven in de schudmachine, die 180 slagen per minuut gaf, uitslag 39 cM., lengte der flesch 24 cM^3, voor $^1/_3$ gevuld; hij experimenteerde o.a. met bac. megaterium.

Hij nam telkens 3 flesschen, één voor contrôle, de twee andere werden geschud; bij de tweede deed hij een of andere fijn korrelige, zware, hoekige substantie, bij de derde niets; 't was hem n.l. gebleken, dat het toevoegen van metallisch kwik, glaspaarlen, zinkvijlsel, schroot, het effect van het schudden bevorderden. Het toevoegen van 't kwik en stukjes metaal waren echter op zich zelf reeds schadelijk en daarom gebruikte hij later alleen glaspaarlen.

Zonder uitzondering gelukte het hem op deze wijze den bacillus megaterium niet alleen te dooden, maar hij hield zelfs niets over dan een fijn stof, ze werden geheel vernietigd.

De kortste tijd was 10 uur; na heel kort schudden, en dit is voor ons van belang, bijv. na 15 à 40 min., scheen vermeerdering waar te nemen, het aantal proeven hiervoor vindt hij zelf echter onvoldoende.

Ook schudden der vloeistof zonder toevoeging van vreemde substantie had steeds een nadeelig effect, mits het lang genoeg werd voortgezet; de kiemen, die in leven bleven, vertoonden steeds vertraagden groei, en langzamer deden ze de gelatine vervloeien.

Andere bacteriën worden sneller of langzamer gedood, slechts enkele waren op den duur tegen schudden bestand.

Een roode bacil uit water vertoonde de eigenaardigheid, dat hij in rust gelaten achteruitging, na 3 dagen schudden 't zelfde bleef, door 2 dagen schudden vermeerderde, door 21 dagen schudden met glaspaarlen gedood werd; „evenals bij de temperatuur hebben we dus ook voor het schudden: minimum, optimum, maximum".

Een gele coccus uit de lucht groeide er steeds beter door. 't Sterkst sprekende is wel de volgende proef. M. plaatste een cultuur van Bac. megaterium 10 dagen in de machinekamer van een brouwerij en zag door het voortdurende trillen, — hoewel aan de deeltjes, die in de vloeistof zweefden, nauwelijks eenige beweging was te zien — alle bacillen afsterven.

Hij vond na het afsterven der bacteriën nooit bacillen of stukken er van terug; op grond hiervan, op grond verder van het feit, dat schudden, zooals het plaats greep in de brouwerij, de bacteriën doodde en op grond van het uiteenloopend effect, dat krachtig schudden op verschillende bacteriën heeft (b. megaterium — gele coccus uit de lucht), komt Meltzer tot het besluit, dat het schudden de cellige elementen nooit in grovere stukken doet uiteenvallen; de cellen worden steeds in een fijn, niet waarneembaar stof veranderd, er volgt een uiteenvallen in moleculen (?). Omgekeerd moet, waar het schudden den groei bevordert, aangenomen worden, dat het voordeelig werkt op de moleculaire beweging.

Dan vraagt M zich af: „Aber welcher Art sind die Theilchen und die Bewegungen?" Hij meent, dat bij het schudden geen sprake is van beweging der physische

eenheden, maar van physiologische eenheden; van die kleinste celdeeltjes, die niet verder gesplitst kunnen worden zonder dat hun stofwisseling schade lijdt; in navolging van FORSTER (Physiology 5 Edit. p. 6) noemt hij ze „Somakulen", dit stellen groepen van chemische moleculen voor. Ze vormen in vegetatief opzicht de eenheid. „Sie sind Ernährungsbezirke, in welchen die Assimilation von Nährstoffen und die Excretion von Abfuhrstoffen einheitlich vor sich gehen."

De onderdeelen der somakulen zijn door een laagje vloeistof gescheiden. M. stelt zich voor, dat door het schudden nu eens de onderdeelen der somakule uit elkaar gerukt worden — de bacterie verdwijnt dan totaal — dan weer zou de beweging het verwijderen der excretieproducten bevorderen, dan is zij bevorderlijk voor den groei en voortplanting der microbe. Dat hangt af van 't meer of minder stevige verband van de onderdeelen der somakule; zoo wordt minimum, optimum en maximum van schudden vastgesteld.

Het is mij echter ten eenenmale onduidelijk, hoe men zich dat moleculair uiteenvallen moet voorstellen. Op een gegeven oogenblik is dus zulk een bacterie nog in zijn geheel, en bemerkt men microscopisch nog niets van den dreigenden ondergang, 't volgende oogenblik is er niets meer over? Zou men dan geen overgangen zien, bacteriën, die gescheurd, of in stukken gebroken waren? Het blijkt niet dat MELTZER dit onderzocht heeft.

MELTZER en WELCH (Centralbl. f. med. Wiss. 1884) vonden bij 't schudden van roode bloedlichaampjes, hoelang ook voortgezet, nooit eenige verandering, geen uit-

treden van haemoglobine. Voegden zij fijnkorrelige, liefst zware, kantige stoffen toe, dan was na verloop van tijd niets meer van de roode bloedlichaampjes terug te vinden. Ook hier dus een moleculair uiteenvallen, en dat door mechanische laesie. Het is bijna niet aan te nemen.

En nu de toepassing op onze proeven.

De juistheid der bovenstaande beschouwingen in 't midden latende en aannemende, dat de microben door schudden kunnen sterven, zoo moeten wij er toch op wijzen, dat dit eerst na zeer langen tijd het geval was (de kortste tijd bedroeg 10 uur), terwijl bij onze kookproeven ook binnen physiologische temperatuurgrenzen de dood in veel korter tijd intrad. Uit het in beroering brengen der vloeistof door de dampbellen is dit dus niet wel te verklaren.

Niettemin heb ik om deze mogelijkheid geheel uit te sluiten, zelf nog meerdere proeven genomen en lucht of gasbellen door microbenhoudende vloeistoffen laten strijken, daarbij zooveel mogelijk de werking van het koken nabootsende.

Bij mijn eerste proef werd de korte buis van een spuitflesch verbonden met de waterstraalluchtpomp, de lange was met zijn eene einde onder de bacteriehoudende vloeistof gedompeld, het andere einde afgesloten door een wattenprop. Door de luchtpomp te laten zuigen, trad de lucht door de wattenprop en borrelde in de vloeistof op, om daarna door 't korte been weggezogen te worden.

Het doorvoeren van lucht op deze wijze, zelfs gedurende eenige uren, was niet in staat het aantal levensvatbare kiemen te verminderen.

Nu zijn de groote luchtbellen, die men op deze wijze

verkrijgt, eigenlijk niet te vergelijken met die, welke door het koken ontstaan en daarom werd getracht de luchtbelletjes kleiner en talrijker te maken. Dit is echter uiterst moeilijk; laat men de lucht strijken door glaspoeder, door kralen, door de sprei van een gieter, altijd zijn er enkele plaatsen, waar de weerstand geringer is, daar gaat steeds de grootste hoeveelheid lucht door, en 't gevolg is, dat men toch weer minder en grootere bellen krijgt.

Ik besloot dus de kolom vloeistof dunner te maken, en daardoor een reeks kleine gasbelletjes op te laten stijgen, de mechanische beweging hierdoor veroorzaakt was minstens even sterk als door koken.

Om onze kookproeven zooveel mogelijk nabij te komen, werd bovendien de vloeistof verwarmd, en de doorgevoerde lucht werd eerst van haar zuurstof beroofd.

De proef werd nu op de volgende wijze ingericht.

De bacteriesuspensie (bac. pyocyaneus) werd gebracht in een buisje van Liborius (Zeitschr. f. Hygiene Bd. I), waarvan het onderste gedeelte vernauwd was (tot 6 Mm.), terwijl het bovenste deel bolvormig was verwijd, met het oog op het spatten der vloeistof.

Het buisje was zoodanig met de zuig- en blaasopening van een waterstraal-luchtpomp verbonden, dat steeds dezelfde lucht er door heen ging. Deze lucht ging nu, alvorens ze in het buisje van Liborius kwam, door drie waschflesschen met pyrogallol en kaliloog en door een vierde waschflesch met water. Deze laatste was evenals de bacteriesuspensie in een waterbad bij 43° geplaatst.

Nu bleek echter, dat bouilloncultuur, ondanks sterke verdunning met keukenzoutoplossing, niet te gebruiken

was wegens het schuimen; ze werd daarom vervangen door een cultuur in 1 ‰ asparagine en glycose, een voedingsbodem, waarmede bac. pyocyaneus zich geheel tevreden stelt; met een weinig van deze cultuur werd dezelfde vloeistof geinfecteerd.

Gelijktijdig werd eenzelfde suspensie, eveneens bij 43°, gekookt, en daarnaast ter contrôle een gedeelte enkel verwarmd bij dezelfde temperatuur. Het bleek nu, dat na verloop van ruim één uur door koken de bac. pyocyaneus reeds gestorven was, terwijl ook na 2 uur in het buisje van Liborius, evenals in de contrôle, nog talrijke kiemen in leven waren, en toch was de mechanische werking der luchtbellen hier veel sterker dan bij het koken.

Ook zonder uitzaaien kan men bij deze proeven waarnemen, of alle kiemen afgestorven zijn of niet, wanneer de proef althans niet al te kort duurt. De vloeistof, waarin de bac. pyocyaneus bleef leven, d. i. in de contrôlebuis, en in het buisje van Liborius, was na afloop duidelijk alkalisch, de suspensie, die gekookt werd, bleef neutraal.

Dat bij dit krachtige schudden door de opstijgende gasbellen de bacillen niet gedood worden, bewijst op afdoende wijze, dat de oorzaak van den dood der bacteriën bij koken niet gezocht moet worden in het bombardeeren der cellen door de dampbelletjes.

In de vierde plaats moet ik wijzen op hetgeen ik in de inleiding reeds zeide. Ik wees er daar op, dat tijdens het koken wellicht in het bacterielichaam microscopische dampbelletjes werden gevormd, die het bacterielichaam vernielden. Om dit te constateeren, moest ik dus liefst

groote microben hebben, waarvan eventueele brokstukken met het microscoop nog goed waarneembaar konden zijn. Bovendien was het wenschelijk te werken bij een temperatuur, die voor de microben in gewone omstandigheden onschadelijk is.

Ik koos voor deze proef eerst gewone gist, en maakte hiervan een suspensie van 10 vol gist in 100 vol 0.5 % nacl. oplossing. Deze is wel is waar geen reine cultuur, maar m. i. was dat hier van ondergeschikt belang.

Voor 't begin van de proef werd een monster der suspensie onder 't microscoop bekeken en vochtig gekleurd met sterk verdund methyleenblauw. Hierbij ziet men de doode cellen zich kleuren, terwijl de levende ongekleurd blijven. (De slappe methyleenblauw-oplossing was niet in staat de levende te dooden en daarna te kleuren.) Daarna werd de gist in de flesch B aan 't koken gebracht bij ± 35°. Ik kon nu af en toe uit de reageerbuis een proefje nemen, dat vochtig kleuren, en door de verhouding van 't aantal ongekleurde tot dat der gekleurde beoordeelen, of door de temperatuur alleen het aantal doode cellen grooter werd.

Van een uiteenspatten of scheuren der gistcellen, ook na 3 uur koken, was geen sprake. De cellen schijnen geheel gaaf te blijven. Zelfs werden de jonge gistcellen niet van de oude afgescheurd. Bij kleuring met verdund methyleenblauw zag ik echter het aantal gekleurde cellen, in verhouding tot de ongekleurde, sneller toenemen in de gekookte, dan in de eenvoudig verwarmde suspensie.

Evenmin kon ik eenige mechanische laesie waarnemen bij Sarcina ventriculi, wanneer ik deze een tijd

lang bij lageren druk kookte; na twee uren koken bij verschillende temperaturen, waren de pakketjes nog geheel intact.

Nu dus geen grovere veranderingen aan de gekookte cellen waren waar te nemen, kon het niet anders of de fijnere structuur van het protoplasma was vernield, de permeabiliteit veranderd, hierin moest de oorzaak van den dood gelegen zijn.

Dat het protoplasma permeabel was geworden, kon ik op verschillende manieren aantoonen. We zagen reeds hoe de cellen zich gedragen tegenover waterig methyleenblauw; thans zullen wij zien, dat door koken het eiwit van 't protoplasma in de vloeistof overgaat, later komen daarbij nog meerdere bewijzen voor het permeabel worden der cellen.

Wanneer ik de gist-suspensie voor het koken of verwarmen filtreerde en op 't heldere filtraat de biureetreactie toepaste, viel deze wel is waar positief uit, hetgeen te wijten is aan de doode cellen, die zich reeds van den beginne af er in bevinden, of aan de cellen, die door 't filter geglipt, den dood vinden door de kaliloog, benoodigd voor de biureet-reactie. Sterker evenwel was de paarsche kleur, verkregen bij de reactie op het filtraat der verwarmde gist, veel sterker nog op de gekookte. Wanneer ik na afloop der proef de gist-suspensie, die eenigen tijd bij lageren druk gekookt had, nog even boven de vrije vlam verwarmde, bleek de reactie na filtreeren weinig sterker te worden.

Het scheen dus, dat een van de oorzaken, waardoor koken bij een temperatuur, die op zich zelf onschadelijk is, de gistcellen kan dooden, hierin moet ge-

zocht worden, dat de wand der cellen permeabel wordt en eiwitstoffen uittreden.

Een ander middel om te constateeren, of de permeabiliteit van het protoplasma veranderd is, werd mij aan de hand gedaan door prof. EYKMAN. Hij had n.l. gevonden, dat het geleidingsvermogen voor electriciteit van een gistsuspensie belangrijk toeneemt, wanneer men de gistcellen, door eenigen tijd te verwarmen bij 60 à 70°, door formaline of door carbolzuur doodt, en meent dit te moeten toeschrijven aan het toenemen der permeabiliteit.

Evenals in de vorige proef nam ik een gistsuspensie in 0.5 nacl. en wel 100 vol. keukenzoutsolutie + 10 vol. gist. Deze suspensie werd in 3 deelen verdeeld. 't Eerste werd bij kamertemperatuur bewaard, de tweede in een waterbad verwarmd tot ± 45°, de derde gekookt bij dezelfde temp. gedurende 2½ uur.

Geheel in overeenkomst met het resultaat door de biureet-reactie verkregen, werd ook hier de grootste weerstand gevonden in de suspensie bij kamertemperatuur bewaard; minder groot, hoewel weinig verschillend, was de weerstand in den inhoud van het kolfje, dat verwarmd was, veel beter geleidend was de gekookte suspensie geworden.

Wanneer ik dit door getallen uitdruk, en den weerstand in het bij kamertemperatuur bewaarde gelijk 100 stel, vond ik:

A. Weerstand suspensie gedurende 2½ uur bij kamertemp. . . . 100
B. » » verwarmd » » » 45° 91
C. » » gekookt » » » » 76.9

Hierna werd de suspensie C nog eens verwarmd tot

± 90°, ten einde zeker te zijn, dat alle cellen gedood waren, de weerstand bleek weinig verminderd: 76.4. (Weerstand der keukenzoutoplossing alleen 80.6.)

Waren de cellen permeabel geworden, dan moest het ook onmogelijk blijken, plasmolyse op te wekken bij gistcellen, die door koken bij lagere temp. gedood waren, immers de uitwisseling van zouten wordt dan niet meer belet. Inderdaad vertoonden de gekookte cellen geen plasmolyse meer.

Daar nu de eenvoudig verwarmde gist bij deze eerste proef ook reeds geleden had, zooals bleek uit de biureet-reactie, het afnemen van den weerstand, en uit de kleuring met waterig methyleenblauw, trachtte ik het verschil tusschen koken en verwarmen der gist nog duidelijker te maken door bij nog lager temperatuur te werken.

Gedurende 3 uur werd een gist-suspensie gekookt bij 27°. 't Resultaat was veel geringer dan door het koken bij 45°. Biureet-reactie, methyleenblauwkleuring toonden geen duidelijk verschil tusschen de gekookte en de verwarmde gist.

De weerstandsbepaling gaf echter nog verschil, zooals blijkt uit de volgende cijfers:

I.	Oorspronkelijke suspensie.	100.
II.	Filtraat dezer suspensie	91.1.
III.	Gekookt bij 27°	96.4.
IV.	Filtraat van III	88.4.
V.	No. III daarna tot 90° verwarmd. .	92.1.
VI.	Verwarmd tot 27°	98.0.
VII.	Filtraat van VI	90.1.
VIII.	No. VII verwarmd tot 90°	93.3.

Uit deze proeven blijkt dus, dat het koken de gistcellen permeabel kan maken, dat deze werking echter door temperatuursverhooging zeer bevorderd wordt.

Ik beproefde daarom den invloed van het koken te verhoogen en wel op dezelfde wijze als voor het dooden van den bac. pyocyaneus is beschreven. De temperatuur wisselde hier eveneens van 40°—36°.

Na ongeveer een uur staakte ik de proef, en zelfs dit brusque koken bleek niet in staat de gistcellen uit elkaar te doen springen, biureetreactie toonde wel verschil aan met die der verwarmde gist, maar toch zeer weinig, evenals de kleuring met methyleenblauw. Slechts uit de weerstandsbepaling bleek weder duidelijk, dat er cellen te gronde waren gegaan.

I.	Weerstand oorspronkelijke suspensie:	100.
II.	Filtraat van I	92.4.
III.	Gekookt ± 1 uur 36 à 40°	97.0.
IV.	Verwarmd tot 36 à 40°	98.5.

Hoewel ik nog verscheiden malen met gist proeven nam, is nooit weer zoo duidelijk het verschil tusschen koken en verwarmen voor den dag gekomen als de eerste maal, toen de temperatuur hooger was dan bij alle volgende proeven.

Het blijkt dus, dat de werking van het koken op de gistcellen geholpen moet worden door een bepaalde temperatuur; kiest men deze te laag, dan treedt het verschil niet duidelijk op, tenzij misschien na langeren tijd; een resultaat dat volkomen overeenstemt met hetgeen wij voor bacterien gevonden hebben.

Een nadeel was verder, dat ik door cultuurproeven niet na kon gaan, wanneer de gistcellen afgestorven

waren, door de sterke verontreiniging met allerlei bacteriën.

Vervolgens vergeleek ik de werking van koken en verwarmen op roode bloedlichaampjes. Hiervoor diende paardeserum, waaraan een aantal roode bloedlichaampjes werden toegevoegd.

Door verwarming bij temperaturen tusschen 35° en 50° trad bij geen dezer proeven eenige verandering op; door koken echter wordt het bloed zwartbruin van kleur, microscopisch vindt men vormlooze bruine klompjes benevens een groot aantal „schimmetjes".

Op den bodem van het vat bevinden zich talrijke bruine stukjes, die onder den druk van het dekglaasje uiteengaan en uit samengepakte schimmen blijken te bestaan. Na centrifugeeren is het serum intensief rood gekleurd door haemoglobine. Neemt men met een pipet een weinig vloeistof van de grens tusschen sediment en vloeistof, dan vindt men daarin behalve vele schimmen enkele eenigszins geel getinte, scherp omlijnde, meestal ronde lichaampjes, hoogst waarschijnlijk stukjes van roode bloedlichaampjes.

Het is eigenaardig, dat al deze veranderingen van de bloedlichaampjes en het serum door koken reeds zeer spoedig optreden en weinig afhangen van de temperatuur. De kookproeven, waarbij bovenstaande resultaten werden verkregen, hadden plaats tusschen 35° en 50°, hetgeen in tijd weinig verschil gaf.

Bij een temp. van 35° is het serum door 10 minuten koken reeds sterk lakkleurig geworden, zelfs na 1 minuut is reeds haemoglobine uitgetreden.

Nu was het nog mooglijk, dat door schudden het bloed

ook reeds lakkleurig werd. Aan bloed, gedurende een uur in een reageerbuis met de hand geschud, kon ik inderdaad, in tegenstelling met MELTZER en WELCH (bl. 50), uittreden van haemoglobine constateeren, al was het ook veel minder dan in het gekookte bloed.

Het scheen mij toe, dat de werking van het koken meer een chemisch dan een mechanisch karakter moest dragen en het spreekt van zelf, dat ik daarbij het eerst aan het eiwit der cellen dacht.

Ik nam daarom kippeneiwit, met tienmaal zijn volume water verdund, en deed dat in de flesch B, tegelijkertijd ter contrôle een paar cM^3. in de reageerbuis *r*. Door ongeveer $^1/_4$ uur te koken bij 49° ontstond er een coagulum, dat als draden door de flesch gespannen was, de vloeistof bleef echter helder evenals die in de reageerbuis; het filtraat uit de oplossing in de flesch vertoonde geen biureetreactie meer. Wanneer ik daarna de temperatuur verhoogde tot ± 60°, trad in den inhoud van de flesch geen coagulatie meer op, terwijl die in 't reageerbuisje melkwit werd. Door het koken bij 49° wordt dus 't eiwit veranderd, gecoaguleerd, door verwarmen bij 49° niet.

Daarna wijzigde ik deze proef eenigzins en nam nu een geheel ei, dat in gaas gewikkeld in de flesch werd gedaan in een 2 % nacl. solutie om zeker te zijn, dat de osmotische spanning van het ei niet grooter was dan van de vloeistof. Gedurende 1 uur werd dit bij 54° gekookt. Bij opening blijkt het eiwit eenigzins troebel, het geel is dik vloeibaar, bij aansteken van den eierdooier met

een mes vloeit het eerst door een vrij groote opening langzaam naar buiten, en wordt aan de oppervlakte stijf, rimpelig.

Nadat ik deze experimenten genomen had, kreeg ik een verhandeling van RAMSDEN onder oogen over het coaguleeren van eiwitstoffen door schudden. (Archiv f. Physiol. 1894).

Hij vond, dat door schudden eiereiwit evenals andere eiwitstoffen bij iedere reactie en zoutgehalte en bij iedere concentratie een stolsel geeft, dat onder het microscoop zeer veel op fibrine gelijkt, draderig, soms vliesvormig. Deze coagula geven de eiwitreactie, doch wijken in vele opzichten van de door hitte verkregen coagula af. Ook met een oplossing van Hofmeister's kristallijn eieralbumine in zuiver water kon hij door schudden deze coagula verkrijgen, een bewijs dus, dat het eiwit en niets dan eiwit is, en dat voor het coaguleeren de mechanische beweging voldoende blijkt.

R. deed een helder gefiltreerde oplossing van kippeneiwit in een cylindrisch vat en verdunde de lucht zoolang tot de manometer een druk aanwees, gelijk aan de spanning der waterdamp bij de temperatuur, waarbij gewerkt werd; dan werd de kraan gesloten en de oplossing geschud, de inhoud vertoonde talrijke vezelige coagula, ten slotte een verwarde massa draden.

Op deze wijze gelukte het hem in $\pm 2 \times 24$ uren 96.4 % van het opgeloste eiwit te doen stollen.

SMEE (Proc. Royal Society XII) verkreeg in een gefiltreerde eiwitoplossing door gedurende 4 uur zuurstof door te voeren een coagulum, dat hij voor fibrine hield; doorvoeren van koolzuur en waterstof gaf geen stolling.

RAMSDEN (l. c.) gelooft hier niet aan de werking der zuurstof, op grond van de coagula in het luchtledige vat, maar meent aan de mechanische werking der opstijgende gasbellen het coaguleeren te moeten toeschrijven.

Uit het vorenstaande blijkt de mogelijkheid, dat bij onze proeven de opstijgende dampbellen de coagulatie hebben veroorzaakt, nog alleen dient opgehelderd te worden, waarom bij koken der eiwitoplossing onder lage drukking de stolling zooveel eerder optreedt dan langs zuiver mechanische wegen en waarom de temperatuur daarbij van zulk een overwegenden invloed is.

Hier was ik dus vrij wel op het doode punt gekomen, en zonder dat mijn verwachtingen erg hoog gespannen waren, begon ik nog eens proeven te nemen met melk, waarbij ik bepaaldelijk het oog had op het enzym van BABCOCK.

Zooals ik bij de bespreking der sterilisatie van melk reeds met een enkel woord aangaf, verdwijnt de reactie op dit enzym eerder, wanneer men de melk kookt dan wanneer ze tot dezelfde temperatuur verwarmd wordt, althans binnen zekere grenzen. Het is bekend en ik wees er reeds op, dat deze reactie geschieden kan met behulp van joodkalistijfsel en H_2O_2, waardoor een blauwe kleur optreedt, wanneer de melk niet boven de 80° verhit werd. Dezelfde reactie met dezelfde kleur krijgt men door H_2O_2 + paraphenyleendiamin of guajactinctuur.

Uit mijn proeven bleek nu, dat deze reactie verdwijnt door verwarmen der melk met of zonder koken tot ± 76° binnen 5 minuten. Werkte ik bij lager temperatuur, dan verdween de reactie door koken eerder dan door

verwarmen; hoe lager de temperatuur genomen wordt, des te grooter tijdsverschil.

Bij 70° bedraagt de tijd voor koken ± 15 min., voor verwarming ± 40 min., terwijl bij 67° binnen het uur door verwarming de reactie niet verdwijnt, door koken nog wel. Verder valt het op, dat bij temperaturen tusschen 65° en 70° de blauwe kleur binnen korten tijd b.v. 15 minuten reeds langzamer optreedt, minder sterk is; het duurt dan nog zeer lang eer de reactie totaal verdwijnt.

Tot mijn groote verwondering bemerkte ik nu, dat door het doorblazen van lucht de reactie eveneens verdwijnt en zelfs bij kamertemperatuur. Mijn eerste vermoeden was nu, dat het z.g. enzym van Babcock geen enzym was, wellicht een vluchtige stof, een gas misschien. Proeven in deze richting genomen, waarbij ik melk in vacuo destilleerde, toonden mij echter door het uitblijven der reactie in het destillaat, dat de gezochte stof niet vluchtig was, tenzij men daarbij aanneemt, dat ze in water niet oplosbaar is, in melk wel. Ik herhaalde nu de proef en deed daarbij in den ontvanger melk, die door even koken de reactie niet meer gaf. Resultaat eveneens negatief. Eindelijk bleek mij dat reeds na louter schudden van de melk in een gesloten buisje de reactie belangrijk verzwakt is.

Was het dus duidelijk uit het coaguleeren der eiwitstoffen en uit het verdwijnen der reactie op het enzym van Babcock gebleken, dat door mechanische werking, lucht doorvoeren, chemische veranderingen kunnen optreden, zoo meende ik dus op grond van deze en voorgaande proeven veilig aan te mogen nemen, dat de

werking van het koken in deze gevallen een mechanische is, aanleiding gevende tot chemische veranderingen. Toen ik nu later gefiltreerd speeksel met 10 maal het volume water verdund, bij 50° gedurende meer dan twee uren kookte en daarnaast verwarmde, werd de reactie op de ptyaline door middel van Joodkalistijfsel gaandeweg zwakker en trager, doch, en hier leg ik den nadruk op, er treedt geen verschil op bij koken of verwarmen.

Wanneer we nu zien, dat ptyaline door koken in zijn werking niet eerder gestoord wordt, dan door verwarming tot diezelfde temperatuur, en dat het z.g. enzym van Babcock juist zeer gevoelig is voor koken en zelfs voor de mechanische beweging door de opstijgende luchtbellen, dan komt het mij zeer twijfelachtig voor, of we hier werkelijk met een enzym te doen hebben.

Uit bovenstaande proeven meen ik te mogen besluiten dat we bij het koken twee verschillende factoren hebben te onderscheiden: 1e de mechanische werking der opstijgende dampbellen; deze doet het eiwit coaguleeren, vernielt het z.g. enzym van Babcock; we kunnen bij deze proeven de dampbellen door luchtbellen vervangen en krijgen hetzelfde effect. In de tweede plaats heeft er bij het koken een werking plaats binnen in de cellen: in de roode bloedlichaampjes, het serum wordt lakkleurig; in de gistcellen, getuigen de verschillende reacties; in de bacteriën, zij sterven.

Na deze uitwijding wil ik terug keeren tot mijn oorspronkelijke vraag: Waarom doodt koken bij lageren druk

de microben sneller dan verwarmen tot dezelfde temperatuur bij gewonen druk?

Ik meen aangetoond te hebben, dat de cellen sterven ten gevolge van de veranderingen in de fijnere structuur van het protoplasma, in aansluiting daaraan worden zij permeabel. Uitgesloten zijn grof mechanische laesies, nooit zag ik iets, dat hierop duidde.

Het schijnt ons dus niet al te gewaagd de volgende onderstelling te maken.

Bij het koken eener suspensie van levende cellen ontstaan intracellulair dampbelletjes, deze vernielen de fijnere structuur van het protoplasma en in aansluiting hieraan wordt de cel permeabel. We zullen zien, wat hier voor te zeggen valt.

Het sneller afsterven der bacteriën door koken wordt er direct door verklaard. Vóór de hypothese pleiten verder:

1°. de kookproeven met gist: kleuring met methyleenblauw, biureetreactie, plasmolyse, weerstandsbepaling, alles wijst in dien geest.

2°. de kookproeven met paardenbloed, het lakkleurig worden van het serum, het groote aantal schimmen.

3°. de experimenten met bac. pyocyaneus en gist, waarbij de temperatuur plotseling van 40° tot 36° werd verlaagd door het reservoir telkens in en uit te schakelen. De bacteriën waren in ¼ deel van den tijd afgestorven, die voor permanent koken bij 40° vereischt wordt. Volkomen is dit verklaarbaar, wanneer men bedenkt, dat door de plotselinge drukverlaging de ontwikkeling der hypothetische dampbelletjes zeer bevorderd moet worden.

Rest dus nog de vraag: waarom staat koken bij lage

drukking in doodende werking ten achter bij verzadigden stoom van dezelfde temperatuur?

Ik zou deze twee werkingen geheel willen scheiden.

Wanneer men bedenkt, dat bij de experimenten met stoom de kiemen gedroogd waren, dan kan men zich voorstellen, dat door opname van hygroscopisch water bij het verblijf in stoom in en buiten de cellen een geconcentreerde zoutsolutie ontstaat, waardoor de bacteriën sterven. Bij het uitdrogen heeft ook wel concentratie plaats, doch dit gaat te snel, daardoor blijven de bacterien nog in leven, ze geraken in een toestand overeenkomende met den winterslaap en bij het koken in 0.9 nacl. oplossing wordt de gevaarlijke concentratie direct verdund.

Voor vegetative vormen is het bekend, dat een geconcentreerde zoutoplossing zeer nadeelig is; ten overvloede deed ik een proef met bac. pyocyaneus: in een verzadigde keukenzoutoplossing sterft hij bij 37° binnen een half uur.

In overeenstemming met deze onderstelling zijn enkele feiten door andere onderzoekers gevonden.

Stoom met lucht gemengd, evenals oververhitte stoom werken minder snel dan verzadigde stoom bij lagere temperatuur; de vereischte hoeveelheid water wordt minder snel aangeboden en opgenomen.

Was dus de onderstelling juist, berustte de snelle dood der bacteriën en sporen door inwerking van verzadigde stoom op het ontstaan om zoo te zeggen van sterke pekel, dan moesten ook de sporen verwarmd in een physiologische zoutoplossing langer blijven leven, dan in een sterkere solutie. Dit controleerde ik op de volgende wijze.

Twee reageerbuisjes, waarvan de eene gedeeltelijk gevuld was met physiologische zoutsolutie, de andere met een verzadigde keukenzout-oplossing werden beide geinfecteerd met miltvuursporen en verwarmd tot 90°. Iedere tien minuten werd uit beide buisjes een monster genomen en daarmee een rolbuis gemaakt Het bleek dat binnen 30 min. de sporen afgestorven waren zoowel in de verzadigde als in de physiologische zoutoplossing.

Onze onderstelling, dat bij de inwerking voor stoom op gedroogd bacteriënhoudend materiaal de geconcentreerde zoutoplossing, die daarbij ontstaat, mede een rol speelt, werd dus wat betreft de vegatieve vormen, bevestigd.

Ten aanzien van sporen daarentegen gaat, zoo als wij trouwens reeds verwachtten, deze verklaring niet op en zal zij dus in andere richting moeten gezocht worden.

BESLUIT.

Het is geen gemakkelijke taak de voornaamste conclusies te trekken uit de resultaten mijner proeven.

Door de verschillende gezichtspunten, die zich telkens voor mij openden, voor een groot deel het gevolg van het kleine aantal onderzoekingen tot nu toe op dit gebied gedaan, werd ik genoodzaakt telkens van den grooten weg af te wijken. 't Gevolg is, dat men in deze bladzijden meer een opeenstapeling van feiten dan een geregeld betoog zal vinden; ik heb getracht zooveel mogelijk de historische volgorde der proeven te bewaren, waaruit blijken kan, hoe ik van de eene waarneming tot de volgende proef kwam.

Steunende op de door mij verkregen resultaten meen ik de volgende gevolgtrekkingen te mogen maken:

Door eenvoudige verwarming sterven in een vloeistof gesuspendeerde bacteriën en sporen minder snel af dan door koken bij dezelfde temperatuur.

Bij verwarming neemt de duur van het afsterven der vegetatieve vormen vrij wel geleidelijk af met stijgende temperatuur.

Door koken onder lage drukking sterven de bacteriën reeds af binnen de physiologische temperatuurgrenzen. De duur van het afsterven neemt met klimmende temperatuur eerst snel, daarna langzamer af.

Deze laatste vorm van kromme verkrijgt men voor sporen zoowel door verwarming als door koken.

Verzadigde stoom overtreft bij iedere temperatuur het koken in doodende werking. Beginnende bij de hoogste temperatuur valt de kromme eerst zeer steil naar beneden, een graad verschil heeft daar weinig invloed op den duur van het afsterven, bij lagere temperatuur neemt die invloed sterk toe.

Van grooten invloed op de resistentie zijn de temperatuur, waarbij de bacillen worden gekweekt, het medium, waarin ze gesuspendeerd zijn; voor sporen bovendien de ouderdom van de cultuur, waaraan ze werden ontleend.

Voor het dooden der vegetatieve vormen, speciaal der pathogene kiemen, is een verwarming gedurende een half uur tot 60° zeker voldoende, bij melk onder voorwaarde, dat het vat gesloten zij. Miltvuursporen worden in water kokende bij atmospherischen druk gedood binnen één minuut, in verzadigden stoom nog eerder.

Verzadigde stoom van 90° staat in werking practisch niet ten achter bij stoom van 100° eveneens verzadigd.

De verklaring van den nadeeligen invloed, dien het koken op de kiemen uitoefent, moet waarschijnlijk gezocht worden in de mechanische werking van dampbelletjes binnen in het bacterielichaam, chemische veranderingen ten gevolge hebbend.

Het is aannemelijk, dat bij inwerking van stoom op gedroogd bacteriemateriaal de concentratie van het celvocht de beslissende factor is.

STELLINGEN.

STELLINGEN.

I.

Desinfectieovens met gespannen stoom bieden geen practisch voordeel aan boven die zonder overdruk werkende.

II.

Bij dieren is de ledige dunne darm steriel.

III.

De juistheid der zijketen-theorie van EHRLICH valt zeer te betwijfelen.

IV.

Ulnair- en radiaalflexie van de hand geschiedt voor een groot deel in het gewricht tusschen de proximale en distale rij der handwortelbeentjes.

V.

De vrees voor besmetting tengevolge van inademen van tuberkelbacillen is ongegrond en onnoodig overdreven.

VI.

De kernleider-theorie, zooals die door HOORWEG en anderen is ontwikkeld, is in staat alle waargenomen verschijnselen bij geleiding in de zenuwen te verklaren.

VII.

Het is waarschijnlijk, dat het grijsworden der haren berust op het wegvoeren van het pigment door zwerfcellen.

VIII.

De cytodiagnostiek geeft geen betrouwbare resultaten bij het beoordeelen van exsudaten.

IX.

Bij open pneumothorax zijn voor het weder uitzetten der long geen vergroeiingen der pleurabladen noodig.

X.

Bij infectieziekten is bestrijding der koorts in alle gevallen aan te bevelen.

XI.

In het ontwerp van het Burg. Wetb. is ten onrechte krankzinnigheid niet onder de gronden opgenoemd, die aanleiding kunnen geven tot echtscheiding.

XII.

Das psychologische Phänomen der Implantation einer Geistesstörung beruht auf Nachahmung aus egoistischem Antriebe. (Max Schönfeldt).

XIII.

Ook bij beginnende tuberculose der ademhalingsorganen is kunstmatige abortus geïndiceerd.

XIV.

Luchtinblazen in de voorste oogkamer is tot nu toe de beste therapie voor tuberculose van de iris.

INHOUD

Bladz

Inleiding 1

HOOFDSTUK I.

Koken bij lage drukking tegenover verwarmen 5

A. Methode van onderzoek 5

B. Resultaten 15

HOOFDSTUK II.

Proeven over sterilisatie door stoom bij lage drukking 33

A. Methode van onderzoek 33

B. Resultaten 37

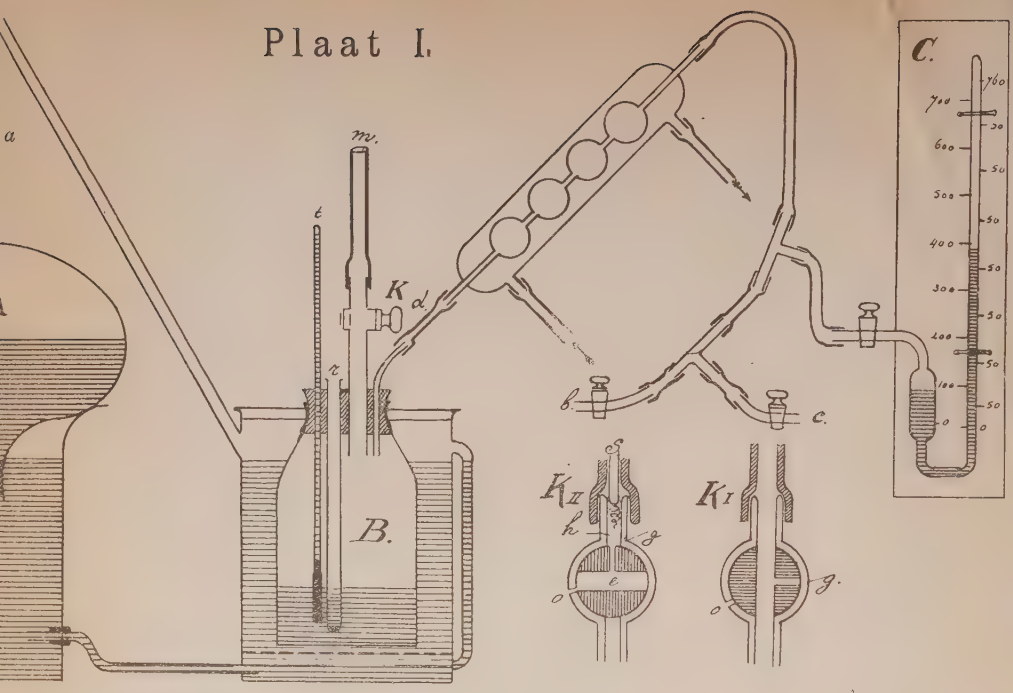
HOOFDSTUK III.

Verklaring van den invloed van het koken en van het stoomen 43

Besluit 72

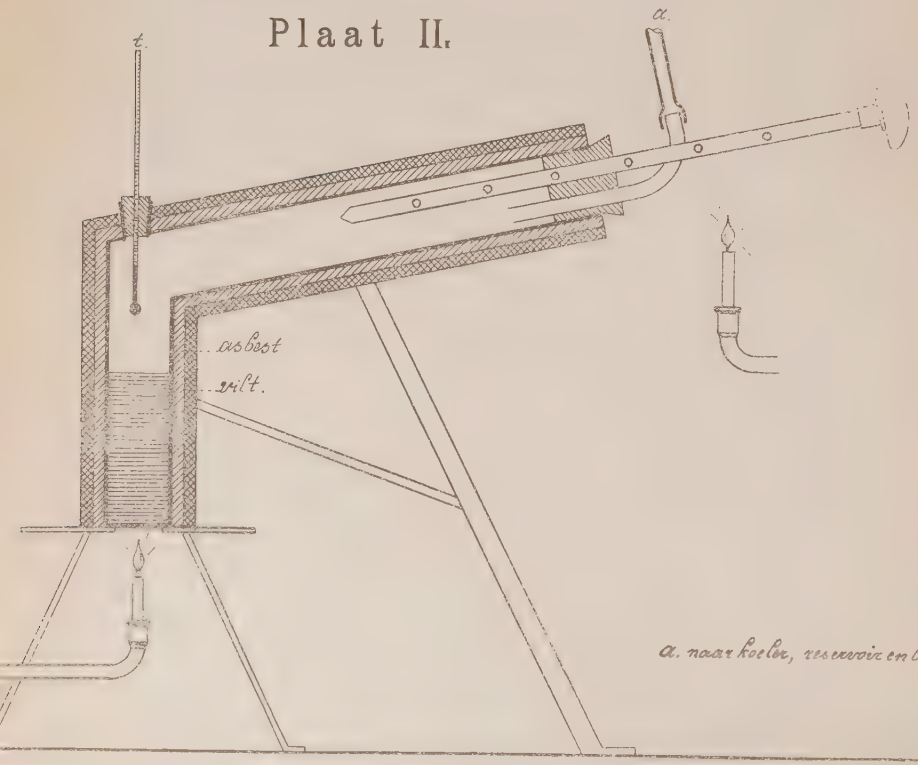
Stellingen 77

Plaat I.



b. naar de waterstraal luchtpomp.
c. naar het luchtreservoir.

Plaat II.



a. naar koeler, reservoir en luchtpomp.